

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biologických a lékařských věd

# OSTATNÍ LIDSKÉ KREVNĚ SKUPINOVÉ SYSTÉMY ERYTROCYTŮ

Helena Košťálková

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: MUDr. Vít Řeháček

Hradec Králové 2012

CHARLES UNIVERSITY PRAGUE  
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové  
Department of Biological and Medical Sciences

# THE OTHER HUMAN RED BLOOD GROUPS SYSTEMS

Helena Košťálková

Thesis

2012

Prohlašuji:

„Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu“.

V Hradci Králové.....

.....

Podpis

## PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu primáři MUDr. Vítu Řeháčkovi za jeho odborné vedení při sepsání diplomové práce, celému kolektivu NRL pro imunohematologii ÚHKT v Praze pod vedením MUDr. Martina Písačky za jejich cenné rady a připomínky při konzultacích.

## SOUHRN

Imunohematologie je oborem studujícím příčiny, průběh a následky obranných reakcí organismu vyvolaných reakcí krevních antigenů a odpovídajících protilátek. Jedním z rizik podání krevní transfuze či těhotenství je imunizace jedince. Reakce mezi antigeny a protilátkami vede k navázání protilátek na erytrocyty a k předčasnému rozpadu erytrocytu. Formování protilátek postihuje 0,1 – 3 % populace. V současnosti je známo kolem 270 skupinových antigenů. Specifita protilátek proti skupinovým systémům Diego, Yt, Xg, Scianna, Dombrock, Colton, Landsteiner-Wiener, Gerbich, Cromer, Knops, Indian, Ok, John Milton Hagen, HFA a LFA je určována pouze v Národní referenční laboratoři pro imunohematologii ÚHKT. Vysoce specializovaná laboratoř používá vhodné metody a tzv. Scarf antiséra a erytrocyty pro identifikaci protilátek proti jmenovaným systémům. V období 1. 1. 2007 – 31. 12. 2011 bylo v NRL pro imunohematologii určeno 102 protilátek proti těmto systémům. Některé z těchto protilátek patří mezi klinicky významné a následná hemoterapie je velice komplikovaná. Nejčastěji byla detekována protilátka proti antigenu s nízkou frekvencí Wr(a) systému Diego.

## **ABSTRACT**

Immunohematology studies antigen-antibody reactions and different forms of antigens and antibodies which cause the immunologic reaction of the organism. One of the hazards of blood transfusion is the immunization of individuals. The reaction between antigens and antibodies leads to the binding of the antibodies on the red blood cells membranes and premature degradation. Development of the antibodies affects about 0.1 – 3 % of the human population. Currently 270 blood group systems are known. The National Reference Laboratory for Immunohematology determines the specificity of antibodies against the blood group systems Diego, Yt, Xg, Scianna, Dombrock, Colton, Landsteiner-Wiener, Gerbich, Cromer, Knops, Indian, Ok, John Milton Hagen, HFA and LFA. For the detection of antibodies against the mentioned blood group systems uses the laboratory proper assays and Scarf – an archive of serum with antibodies and red blood cells containing the special antigens. Over the time period since 1<sup>st</sup> January 2007 till 31<sup>st</sup> December 2011 102 antibodies against the named blood group systems were detected. Some of these antibodies are clinically significant and subsequent hemotherapy is very complicated. The most detected antibody was anti-Wr(a), an antibody against the low frequent antigen Wr(a) Diego system.

## **CÍL PRÁCE - ZADÁNÍ PRÁCE**

Cílem této práce je navázat na bakalářskou práci, která se zabývala běžně vyšetřovanými krevně skupinovými systémy MNSs, P1, Lutheran, Kell, Lewis, Duffy, Kidd a Diego. Diplomová práce má za úkol rozšířit znalosti o další antigeny krevních skupin. Jedná se o systémy, které jsou někdy těžko identifikovatelné, problematické vzorky musí být došetřeny specializovanými metodami určenými k jejich detekci na specializovaných pracovištích.

Cílem práce je:

- a) detailnější seznámení s jednotlivými antigeny vybraných krevních systémů,
- b) popsat specializované metody používané k vyšetření problematických imunohepatologických vzorků,
- c) ukázat na nebezpečí některých protilátek proti těmto antigenům,
- d) poukázat na další funkce erytrocytárních antigenů.

## SEZNAM ZKRATEK

AchE	Acetylcholinesteráza
ADP	Adenosindifosfát
AGH	Antihuman globulin
AE	Anion Exchanger
AET	Aminoethylisothiuronium bromid
AIHA	Autoimunitní hemolytická anémie
AQP	Aquaporin
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DTT	Dithiotreitol
HFA	High frequency antigen
HON	Hemolytické onemocnění plodu a novorozence
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
ERMAP	Erytrocytární transmembránový adhezivní receptor
GPI	Glykofosfatidylinositol
Ig	Imunoglobulin
IgS	Imunoglobulin Superfamily
ISBT	International Society of Blood Transfusion
LISS	Low Ionic Salt Solution
LFA	Low frequency antigen
MAIE	Monoclonal Antibody Immobilization of Erythrocytes
MIP	Major intrinsic protein (hlavní integrální protein)
NAT	Nepřímý antiglobulinový test



PAT	Přímý antiglobulinový test
PEG	Polyethylen glykol
PNH	Paroxysmální noční hemoglobinurie
Rh	Rhesus faktor
SAO	Southeast Asian ovalocytosis
SCARF	Serum, Cells & Rare Fluids exchange
SNP	Single Nucleotide Polymorphism, jednonukleotidový polymorfismus
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism Analysis
ÚHKT	Ústav hematologie a krevní transfúze

## OBSAH

1. ÚVOD.....	15
2. SYSTÉM DIEGO (Di) .....	17
2.1. Antigeny systému Diego .....	18
2.1.1. Di <sup>a</sup> a Di <sup>b</sup> (DI1 a DI2).....	18
2.1.2. WRIGHT: Wr(a) a Wr(b) (DI3 a DI4).....	19
2.1.3. Antigeny s nízkou frekvencí výskytu systému Diego.....	19
2.2. Band 3, erytrocytární anionový měnič .....	20
2.3. Jihovýchodní asijská ovalocytóza (SAO) a alterovaná forma proteinu band 3...22	
3. SYSTÉM Yt .....	22
3.1. Yt antigeny a erytrocytární acetylcholinesteráza .....	22
3.1.1. Přejídný fenotyp Yt(a-b-), anti-Yt <sup>ab</sup> a AChE deficeie .....	22
3.1.2. Antigeny Yt <sup>a</sup> a Yt <sup>b</sup> .....	22
3.2. Molekulární genetik .....	23
3.3. Vliv enzymů a redukčních agens.....	23
3.4. Protilátky proti systému Yt.....	23
4. SYSTÉM Xg .....	24
4.1. Dědičnost Xg .....	24
4.2. Antigeny Xg .....	24
4.3. Protilátky systému Xg .....	25
5. SYSTÉM Scianna (Sc) .....	25
5.1. Antigeny systému Scianna.....	25
5.1.1. Antigeny Sc1 a Sc2.....	25
5.1.2. Antigen Sc3.....	26
5.1.3. Radin antigen (Rd, Sc4) .....	26
5.1.4. STAR antigen (Sc5) .....	26
5.1.5. SCER (Sc6) a SCAN (Sc7) antigeny .....	26
5.2. Vlastnosti SCIANNA glykoproteinu .....	27
5.3. Protilátky proti systému Scianna .....	27
5.4. Molekulární základ SCIANNA systému .....	28
6. SYSTÉM DOMBROCK.....	29
6.1. Glykoprotein DOMBROCK.....	29
6.2. Antigeny DOMBROCK.....	30

6.2.1. Do <sup>a</sup> a Do <sup>b</sup> (DO1 a DO2) .....	30
6.2.2. Gy <sup>a</sup> (DO3) a DOMBROCK null fenotyp .....	30
6.2.3. Hy (DO4) .....	30
6.2.4. Jo <sup>a</sup> (DO5) .....	30
6.3. Molekulární genetika .....	31
6.4. Protilátky systému DOMBROCK .....	33
6.4.1. Anti-Do <sup>a</sup> a anti-Do <sup>b</sup> .....	33
6.4.2. Anti-Gy <sup>a</sup> , -Hy a anti-Jo <sup>a</sup> .....	33
7. SYSTÉM COLTON .....	33
7.1. Glykoprotein COLTON, AQUAPORIN-1 .....	33
7.2. Antigeny systému Colton .....	34
7.2.1. Antigeny Co <sup>a</sup> a Co <sup>b</sup> (Co1 a Co2) .....	34
7.2.2. Co3, Co (a-b-) fenotyp .....	34
7.3. Molekulární struktura .....	35
7.4. Colton antigeny a monozomie 7 .....	35
7.5. Protilátek proti systému Colton .....	36
7.5.1. Anti-Co <sup>a</sup> .....	36
7.5.2. Anti-Co <sup>b</sup> .....	36
7.5.3. Anti-Co3 .....	36
8. SYSTÉM Landsteiner-Wiener .....	36
8.1. Historie .....	36
8.2. Antigeny LW .....	37
8.3. ICAM-4 glykoprotein .....	38
8.4. LW protilátky .....	38
9. SYSTÉM GERBICH .....	38
9.1. Biochemie .....	38
9.2. Molekulární genetika a dědičnost .....	40
9.3. Antigeny Gerbich .....	40
9.4. Protilátky proti systému Gerbich .....	41
9.5. Hereditární eliptocytóza .....	42
9.6. Malárie .....	43
10. SYSTÉM CROMER .....	43
10.1. PROTEIN DAF NOSIČ a SKUPINOVÝ SYSTÉM CROMER .....	44
10.2. Charakteristika antigenů a protilátek systému CROMER .....	45
10.2.1. Cr <sup>a</sup> (CROM1) .....	45

10.2.2. Tc <sup>a</sup> (CROM2), Tc <sup>b</sup> (CROM3), Tc <sup>c</sup> (CROM4) .....	45
10.2.3. Dr <sup>a</sup> (CROM5) .....	46
10.2.4. Es <sup>a</sup> (CROM6) .....	46
10.2.5. IFC (Inab fenotyp) (CROM7) .....	47
10.2.6. WES <sup>a</sup> (CROM8), WES <sup>b</sup> (CROM9) .....	47
10.2.7. UMC (CROM10) .....	48
10.2.8. GUTl.....	48
10.3. Klinický význam protilátek systému Cromer .....	49
11. SYSTÉM Knops .....	49
11.1. Historie .....	49
11.2. Receptor 1 (CR1) a systém Knops.....	51
11.3. Helgeson, null fenotyp systému Knops? .....	51
11.4. Antigeny systému Knops.....	52
11.4.1. Kn <sup>a</sup> a Kn <sup>b</sup> (KN1 a KN2).....	52
11.4.2. McC <sup>a</sup> a McC <sup>b</sup> (KN3 a KN4).....	52
11.4.3. S <sup>la</sup> a Vil (KN4 a KN7).....	53
11.4.4. Yk <sup>a</sup> .....	53
11.4.5. Cs <sup>a</sup> a Cs <sup>b</sup> .....	53
11.5. Charakteristika antigenů systému Knops .....	53
11.6. Protilátky proti systému Knops .....	54
11.7. Onemocnění spojené s CR1 .....	54
12. SYSTÉM Indian a AnWj antigen .....	55
12.1. CD44 a Indian antigeny .....	55
12.2. Antigeny Indian .....	56
12.2.1. In <sup>a</sup> a In <sup>b</sup> (IN1 a IN2).....	56
12.2.2. IN3 (INFI) a IN4 (INJA) .....	56
12.3. Protilátky proti systému Indian .....	56
12.4. Antigen AnWj.....	57
13. SYSTÉM Ok .....	57
13.1. Antigeny systému Ok .....	57
13.2. Molekulární genetika .....	57
13.3. Biochemie .....	58
13.4. Protilátky proti systému Ok .....	58
14. SYSTÉM RAPH.....	58
14.1. MER2 polymorfismus erytrocytů a antigen MER2 (RAPH1) .....	58

14.2. Protilátky proti MER2 .....	59
15. SYSTÉM JMH .....	59
15.1. JMH (JMH1).....	59
15.2. Anti-JMH.....	59
15.3. JMH se nachází na semaforinu CDw108 .....	60
16. Antigen s nízkou frekvencí výskytu.....	60
16.1. Antigeny LFA .....	61
16.2. Protilátky .....	62
17. Antigeny s vysokou frekvencí výskytu .....	63
17.1. Vel .....	63
17.2. Lan .....	64
17.3. At <sup>a</sup> (August) .....	65
17.4. Jr <sup>a</sup> .....	65
17.5. Emm .....	65
17.6. AnWj.....	65
17.7. Duclos.....	66
17.8. PEL.....	66
17.9. ABTI.....	66
17.11. GIL.....	66
18. POUŽÍVANÉ METODY V IMUNOHEMATOLOGII .....	66
18.1. Základní metody používané v imunohematologii.....	66
18.2. Postup vyšetření AGH testů .....	67
18.3. Doplnující diagnostika a metody pro zvýšení senzitivity AGH testů .....	71
18.3.1. Potenciátory .....	71
18.3.2. Enzymatický test .....	71
18.4. Speciální diagnostika .....	72
18.5. Metody izolace protilátky.....	73
19. PRAKTICKÁ ČÁST .....	74
19.1. ČETNOST VÝSKYTU PROTILÁTEK .....	74
19.2. KAZUISTIKY VYŠETŘOVANÉ NA ÚHKT .....	79
19.2.1. Kazuistika č. 1: anti-Vel .....	79
19.2.2. Kazuistika č. 2 : anti-Rd(a) .....	83
19.2.3. Kazuistika č.3: anti-Lw(a).....	89
19.2.4. Kazuistika č.4: anti-Ge.....	93
19.2.5. Kazuistika č. 5: anti-Wr(a) .....	101

19.2.6. Kazuistika č.6 : anti-Yt(a) .....	103
19.2.7. Kazuistika č. 7: anti-Jr(a).....	106
20. DISKUZE.....	108
21. ZÁVĚR.....	109
23. LITERATURA.....	111

## 1. ÚVOD

### 1. ÚVOD

Imunohematologie je vědní obor zabývající se studiem antigenů a protilátek, které mají souvislost s krevní transfuzí, transplantacemi kostní dřeně, imunitními reakcemi u krevních chorob či způsobují komplikace během těhotenství.

Od objevení prvních skupinových systémů až po současnost bylo prokázáno kolem 270 skupinových antigenů. Každý skupinový systém se skládá z určitého počtu antigenů kódovaných jedním samostatným genem nebo více velmi těsně vázanými geny. Nomenklatura podle ISBT zahrnuje 26 skupinových systémů. Každému systému byl přidělen číselný symbol, který je tvořen ze 3 číslic a z abecedních symbolů (viz tabulka 1).

Tabulka 1: Skupinové systémy dle ISBT nomenklatury [6]

KS	ISBT označení	Symbol konvenční	Systém symbol ISBT	Chromozomální lokace
AB0	001	AB0	AB0	9q34.1-q34.2
MN	002	MN	MNS	4q28-q31
P	003	P	P1	22q11.2-qter
Rh	004	Rh	RH	1p36.2-p34
Lutheran	005	Lu	LU	19q12-q13
Kell	006	K	KEL	7q33
Lewis	007	Le	LE	19p13.3
Duffy	008	Fy	FY	1q22-q23
Kidd	009	Jk	JK	18q11-q12
Diego	010	Di	DI	17q12-q21
Cartwright	011	Yt	YT	7q22
Xg	012	Xg	XG	Xp22.32
Scianna	013	Sc	SC	1p36.2-p22.1
Dombrock	014	Do	DO	12p13.2-p12.1
Colton	015	Co	CO	7q14
LW	016	LW	LW	19p13.2-cen
Chido/Rodgers	017	Ch/Rg	CH/RG	6p21.3
Hh	018	H	H	19q13
Kx	019	Kx	XK	Xp21.1
Gerbich	020	Ge	GE	2q14-q21
Cromer	021	Cromer	CROM	1q32
Knops	022	Kn	KN	1q32
Indian	023	In	IN	11p13
Ok	024	OK		
Raph	025	RAPH		
John Milton Hagen	026	JMH		



## 2. SYSTÉM DIEGO (Di)

### 2. SYSTÉM DIEGO (Di)

Skupinový systém Diego se skládá z 21 antigenů: ze dvou párů antitetických antigenů  $Di^a$  a  $Di^b$ ,  $Wr^a$  a  $Wr^b$ , a ze 17 antigenů s nízkou frekvencí výskytu (tabulka 2).

Antigen  $Di^a$  je velmi významným antropologickým znakem. Tento antigen se nachází téměř výhradně u indiánů, původních obyvatel severní a latinské Ameriky a dále v mongoloidní populaci především východní a centrální části asijského kontinentu. V dalších etnických skupinách se téměř nenachází.

Krevní skupina Diego byla objevena v roce 1955 a pojmenována podle pacientky, u které byly zjištěna protilátka (později označená jako anti- $Di^a$ ) proti novému skupinovému antigenu. Pacientka porodila dítě s HON. V roce 1967 byl popsán další Diego antigen,  $Di^b$ . [1,2,3,4,8,9

Tabulka 2: Antigeny skupinového systému Diego [6]

Antigen číslo	Název	Relativní výskyt	Poprvé popsán	Molekulární základ
DI1	$Di^a$	<0,1	1955	Leu854(Pro)
DI2	$Di^b$	>99,9	1967	Pro854
DI3	$Wr^a$	<0,1	1953	Lys658(Glu)
DI4	$Wr^b$	>99,9	1971	Glu658
DI5	$Wd^a$	<0,1	1981	Met557(Val)
DI6	$Rb^a$	<0,1	1978	Leu548(Pro)
DI7	WARR	<0,1	1991	Ile552(Thr)
DI8	ELO	<0,1	1993	Trp432 (Arg)
DI9	Wu	<0,1	1976	Ala565 (Gly)
DI10	$Bp^a$	<0,1	1966	Lys569(Asn)
DI11	$Mo^a$	<0,1	1972	His656 (Arg)
DI12	$Hg^a$	<0,1	1983	Cys656 (Arg)
DI13	$Vg^a$	<0,1	1981	His555 (Tyr)
DI14	$Sw^a$	<0,1	1959	Gln nebo Trp646 (Arg)
DI15	BOW	<0,1	1988	Ser561 (Pro)
DI16	NFLD	<0,1	1984	Asp 429 (Glu); Ala561 (Pro)
DI17	$Jn^a$	<0,1	1967	Ser566(Pro)
DI18	KREP	<0,1	1997	Ala566(Pro)
DI19	$Tr^a$	<0,1	1975	Asn551(Lys)
DI20	Fra	<0,1	1978	Lys480(Glu)
DI21	SW1	<0,1	1987	Trp646(Arg)

## 2. SYSTÉM DIEGO (Di)

### 2.1. Antigeny systému Diego

#### 2.1.1. Di<sup>a</sup> a Di<sup>b</sup> (DI1 a DI2)

Antitetický pár Di<sup>a</sup> a Di<sup>b</sup> vzniká v důsledku jednonukleotidové substituce 2651T>C, která vede k změně aminokyseliny Leu854Pro na proteinu Band3.

Antigen Di<sup>a</sup> se nachází především u severoamerických indiánů, vzácně se objevuje mezi Inuity (Eskymáky) na Aljašce a v Kanadě. Velice běžně se také vyskytuje u sibiřských Inuitů. Di<sup>a</sup> se v populaci lidí z jihovýchodní Asie objevuje v 2 – 12 %. Častěji je detekován na erytrocytech Japonců než u Číňanů.

Jen ve velmi vzácných případech je Di(a+) diagnostikován na erytrocytech bělochů. Di<sup>a</sup> zcela chybí u původních obyvatel Austrálie a Oceánie. Velice vzácně je zachycen u Afričanů.

Dle Mendlových zákonů dědičnosti je antigen Di<sup>a</sup> děděn jako dominantní znak.

Antigeny Di<sup>a</sup> a Di<sup>b</sup> jsou rezistentní vůči působení enzymů papainu, trypsinu, α-chymotrypsinu, pronázy, sialidázy a proti chemikáliím DTT a AET. [1,9]

#### Protilátky anti-Di<sup>a</sup> a anti-Di<sup>b</sup>

Di<sup>a</sup> a Di<sup>b</sup> jsou plně exprimovány již při narození. Protilátka anti-Di<sup>a</sup> je zodpovědná za případy HON. Některé případy měly fatální následky.

Anti-Di<sup>a</sup> může způsobit akutní hemolytickou potransfuzní reakci. Komerčně vyráběné panelové erytrocyty často neobsahují Di<sup>a</sup> antigen. Tato protilátka je prokazována velice zřídka, objevuje se především v Americe, kde je incidence Di(a+) relativně vysoká u původních obyvatel.

Anti-Di<sup>b</sup> může dále způsobit pozdní hemolytickou potransfuzní reakci a HON.

Tyto protilátky jsou snadno detekovány pomocí NAT. Byly ovšem popsány příklady zachytu těchto protilátek i přímou aglutinací.

Anti-Di<sup>a</sup> a anti-Di<sup>b</sup> jsou často typu IgG1 a IgG3 a jen v některých případech protilátka anti-Di<sup>a</sup> může aktivovat komplement.

Do současné doby nebyl prokázán fenotyp Di(a-b-).[1,9]

## 2. SYSTÉM DIEGO (Di)

### 2.1.2. WRIGHT: Wr(a) a Wr(b) (DI3 a DI4)

Druhý antitetický pár  $Wr^a$  a  $Wr^b$  vzniká nukleotidovou substitucí 1972A>G, která vede k záměně aminokyseliny Lys658Glu na proteinu Band 3. Četnost výskytu je  $Wr^a$  je u bělošské populace kolem 0,7 %. Antigen  $Wr^a$  je děděn jako autozomální znak.

$Wr^a$  vykazuje různorodost v síle jeho exprese u různých jednotlivců a je plně vyvinut již při narození. Extrémně vzácný fenotyp  $Wr(a-b-)$  byl nalezen u jedince s raritní variantou glykoforinu. Exprese antigenu  $Wr^b$  je závislá na přítomnosti funkčního glykoforinu A.  $Wr^a$  a  $Wr^b$  antigeny jsou rezistentní vůči vlivu enzymů či DTT.

Ani jeden z těchto antigenů nebyl nalezen na lymfocytech, granulocytech či monocyttech. [1,8,9]

#### Protilátka anti-Wr(a)

Anti-Wr(a) patří mezi nejčastěji se vyskytující protilátky proti antigenům s nízkou frekvencí výskytu. Některé protilátky Anti-Wr(a) mohou být prokázány přímou aglutinací. Výskyt této protilátky se dramaticky zvyšuje u žen po porodu a u pacientů senzibilizovaných jinými aloprotilátkami. Anti-Wr(a) často aglutinuje erytrocyty v solném prostředí. Silněji reaguje při pokojové teplotě než při 37 °C. Anti-Wr(a) protilátka je především typu IgM a až následně IgG.

Anti-Wr(a) protilátka může způsobit HON i hemolytickou potransfuzní reakci. Vyskytuje se u pacientů s onemocněním autoimunní hemolytickou anémií.

#### Protilátka Anti-Wr(b)

Protilátka anti- $Wr^b$  se především detekuje v podobě autoprotilátky. U dvou pacientů s autoprotilátkou anti-Wr(b) byla prokázána autoimunní hemolytická anémie. U dvou pacientů s PAT pozitivním testem byla detekována protilátka anti-Wr(b), která byla zodpovědná za fatální intravaskulární hemolýzu. [1,8]

### 2.1.3. Antigeny s nízkou frekvencí výskytu systému Diego

Systém Diego zahrnuje dalších 17 antigenů s nízkou frekvencí výskytu DI5 až DI21 (tabulka 2). Tyto antigeny vznikají záměnou jedné aminokyseliny vně nebo blízko extracelulární smyčky proteinu band 3. Výjimkou z je antigen NFLD (DI16), u kterého byla zaznamenána substituce dvou aminokyselin a antigen  $Sw^a$  (DI14), který je reprezentován záměnou dvou aminokyselin v jedné pozici (viz tabulka 2). Mnohé změny aminokyselin jsou lokalizovány na třetí a čtvrté extracelulární doméně proteinu band 3.

## 2. SYSTÉM DIEGO (Di)

ELO a NFLD substituce se nachází na první smyčce,  $Fr^a$  je umístěn blízko druhé smyčky a  $Di^a/Di^b$  polymorfismus je lokalizován na smyčce 7. [1]

### Protilátky proti DI5 až DI21

Protilátky proti Diego antigenům s nízkou frekvencí výskytu nejsou převážně klinicky významné. Výjimku tvoří protilátka anti-ELO, která může způsobit hemolytické onemocnění novorozence a plodu. Byl zaznamenán případ těhotné ženy, u které byla během druhého těhotenství detekována protilátka anti-ELO. Po porodu se u novorozence projevilo středně těžké HON. Při třetím těhotenství mělo dítě těžký HON, které vyžadovalo výměnnou transfuzi. Protilátka anti-ELO byla typu IgG (především IgG3) a i IgM. [1]

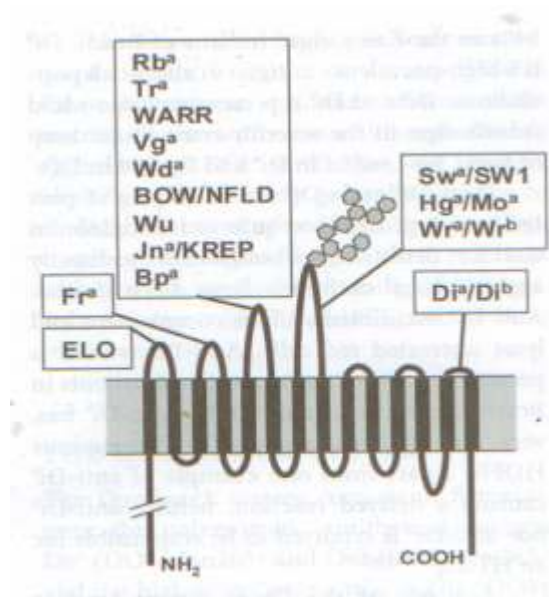
Protilátka anti- $Fr^a$  způsobuje pozitivní PAT u pupečnickové krve, ale nezpůsobuje HON.

### **2.2. Band 3, erytrocytární anionový měnič**

Protein Band 3 (Anionový měnič, AE1, CD233) je hlavní erytrocytární integrální membránový glykoprotein s přibližně  $10^6$  kopií na erytrocyt. Band 3 protein je kódován genem SLC4A1 („Solute Carrar family 4 Anion excanger, member 1“), který se nachází na chromozomu 17. Protein Band 3 plní funkci rychlého měniče  $HCO_3^-$  a  $Cl^-$  iontů. Propouští ionty  $HCO_3^-$  výměnou za  $Cl^-$  ionty, čímž předchází akumulaci  $HCO_3^-$  v erytrocytech. Tento transport  $HCO_3^-$  v plazmě zvyšuje množství  $CO_2$  v krvi, jež je poté dopravován do plic. Tuto transportní činnost zajišťuje druhá extracelulární smyčka bandu 3. Další funkcí tohoto proteinu je funkce strukturální. Band 3 uchycuje erytrocytární membránu na cytoskelet. N-terminální doména je spojena přes glykoproteiny ankyrin, band 4.2 a band 4.1. s cytoskeletem membrány erytrocytů. Mutace proteinu band 3 vede k abnormalitám tvaru erytrocytů. [1,8]

## 2. SYSTÉM DIEGO (Di)

Obrázek 1: Schéma Band 3, Diego glykoprotein a anionový měnič. Umístění 21 antigenů Diego systému na extracelulární smyčce.[3]



SLC4A1 gen pro protein band 3 pokrývá 18kb DNA a obsahuje 20 exonů. Band 3 se skládá ze tří domén:

- cytoplazmatické N-terminální domény, tvořené ze 403 aminokyselin;
- hydrofobní transmembránové domény o 479 aminokyselin,
- C-terminálního cytoplazmatického konce tvořeného z 29 aminokyselin.

Band 3 se vyskytuje v membráně erytrocytů v podobě dimeru a vyššího oligomeru. Jako tetrametr se navazuje na ankyrin. Band 3 pravděpodobně také hraje roli v odstranění odumírajících erytrocytů z krevního oběhu. Ovlivňuje expresi Rh proteinů a glykoproteinů spojených s Rh a může zvyšovat translokaci celého Rh komplexu na membráně nebo mít vliv na jeho konformaci v membráně. Nachází se pouze v určitém druhu tkání. Mimo erytrocytární membrány byl band 3 detekován pouze v interkalárních buňkách ledvin. Je součástí vylučování kyselých látek pomocí odstraňování  $H^+$  z iontu  $HCO_3^-$  [1,8]

### Band 3 deficiency (Diego null fenotyp)

Deficience proteinu band 3 na erytrocytech je s životem neslučitelný stav. Do současné doby nebyl ještě zaznamenán Diego null fenotyp.

### 3. SYSTÉM Yt

#### 2.3. Jihovýchodní asijská ovalocytóza (SAO) a alterovaná forma proteinu band 3

Jedná se o typ dědičné ovalocytózy. Toto onemocnění se vyskytuje v oblasti jižního Pacifiku a chrání děti proti vzniku určitého typu malárie, tzv. cerebrální malárie způsobené parazitem *Plasmodium falciparum*. SAO vzniká následkem heterozygotní formy genu proteinu band 3 s delecí 27 bp. Tato mutace kóduje variantu proteinu (band 3 SAO) s delecí aminokyselin 400-408, což je oblast proteinu cytoplazmatické N-terminální domény a první smyčky membránové domény. Nebyla zaznamenána homozygotní forma tohoto onemocnění. Tento druh mutace by vedl k inaktivaci band 3 a byl by pro jedince letální.[1,2,3,4,5,8]

### 3. SYSTÉM Yt

Systém Yt, který je často nesprávně označován jako Cartwright systém, je tvořen dvěma antigeny: Yt<sup>a</sup> a Yt<sup>b</sup>. Nosičem antigenů systému Yt je erytrocytární glykoprotein GPI pojmenovaný jako acetylcholinesteráza (AChE). [1,2,9]

#### 3.1. Yt antigeny a erytrocytární acetylcholinesteráza

V roce 1991 Spring a spol. [1] prokázali pomocí imunoprecipitace spolu s metodou MAIEA přítomnost antigenů Yt<sup>a</sup> a Yt<sup>b</sup> na GPI-kotvě erytrocytárního glykoproteinu AChE. Acetylcholinesteráza je produkt AChE genu umístěného na chromozomu 7q22. Funkce tohoto enzymu v erytrocytech není známa. Acetylcholinesteráza je enzym, který se aktivně účastní přenosu nervového vzruchu. AChE rozkládá neurotransmiter acetylcholin na cholin a acetát. Acetylcholin zprostředkovává přenos vzruchu v centrální a periferní nervové soustavě. [1,2,3,4,5,9]

##### 3.1.1. Přejídný fenotyp Yt(a-b-), anti-Yt<sup>ab</sup> a AChE deficeie

Yt antigeny se nenacházejí na erytrocytech jedinců s paroxysmální noční hemoglobinurií (PNH) typu III nebo je u těchto jedinců radikálně snížena jejich exprese. V případě onemocnění PNH schází GPI glykoprotein, a z tohoto důvodu Yt antigeny nejsou detekovány na erytrocytech postiženého jedince, tak jako ostatní antigeny, které se nacházejí na GPI kotvě glykoproteinu, např. Dombrock systém. [1,9]

##### 3.1.2. Antigeny Yt<sup>a</sup> a Yt<sup>b</sup>

Yt<sup>a</sup> antigen patří mezi antigeny s vysokou frekvencí výskytu. Nachází se přibližně u 99.8 % jedinců a naopak Yt<sup>b</sup> patří mezi antigeny s nízkou frekvencí výskytu. Byl de-

tekován pouze u 8 % populace. Incidence Yt<sup>b</sup> antigenu je vysoká u Izraelců 24 – 26 %. U této národnosti byl zároveň zaznamenán nižší výskyt antigenu Yt<sup>a</sup>.

*Tabulka 3: Fenotyp Yt (výskyt v %)*

Fenotyp	Ve většině populací
Yt (a+b-)	91,9
Yt (a+b+)	7,8
Yt (a-b+)	0,3

Yt<sup>a</sup> není přítomen na lymfocytech, monocytech a granulocytech.

Yt antigeny jsou detekovány v pupečnickové krvi. U novorozenců je antigen Yt<sup>b</sup> zcela vyvinut a antigen Yt<sup>a</sup> se vyskytuje v pupečnickové krvi ve slabší formě než na erythrocytech dospělého člověka. [1,2,9]

### **3.2. Molekulární genetika**

Polymorfismus Yt<sup>a</sup>/Yt<sup>b</sup> vzniká na základě dvou jednonukleotidových změn AChE genu. První mutace se týká C1057A na exonu 2, který kóduje substituci His353Asn. Druhý příklad se týká tzv. tiché mutace C1432T na exonu 3 kódující Pro477. [1,9]

### **3.3. Vliv enzymů a redukčních agens**

Yt<sup>a</sup> antigen je senzitivní na enzymy ficin a papain. Není ovlivněn působením enzymu trypsin, ale je naproti tomu degradován  $\alpha$ -chymotrypsinem. Yt<sup>a</sup> a Yt<sup>b</sup> jsou citlivé na působení chemikálií AET a DTT, které narušují disulfidické vazby. [1,4,5,9]

### **3.4. Protilátky proti systému Yt**

Přestože fenotyp Yt(a-b+) se vyskytuje relativně málo, byla detekována vysoká četnost anti-Yt<sup>a</sup> protilátky. Záchyt protilátky anti-Yt<sup>b</sup> je velice vzácný. Anti -Yt<sup>a</sup> a anti-Yt<sup>b</sup> vznikají stimulací v těhotenství nebo podáním transfuze. Žádná z protilátek nebyla zachycena v podobě přirozené protilátky.

Yt protilátky jsou především IgG, podtřídy IgG1 či IgG4 a jsou nejlépe zachyceny pomocí antiglobulinového testu. Některé z anti-Yt<sup>a</sup> protilátek aktivují komplement.

Yt protilátky nezpůsobují hemolytické onemocnění novorozence. Uvádí se, že protilátka anti-Yt<sup>a</sup> může v některých případech vyvolat těžkou pozdní potransfuzní hemolytickou reakci.[1,2,3,4,5,9]

### 4. SYSTÉM Xg

Xg systém není příliš brán v potaz z pohledu reakcí antigenů a protilátek. Je respektován a znám svým přispěním v oblasti chromozomálního a genetického mapování. Xg je jediný systém, který je umístěn na pohlavních chromozomech. Skládá se ze dvou antigenů Xg a CD99, které představují jedinečnou fenotypovou příbuznost. Tento systém popsal v roce 1962 Mann a spol.[10] Xg antigen je exprimován pouze na erytrocytech, naproti tomu antigen CD99 se nachází i na ostatních tkáňových buňkách. Anti-Xg se vyskytuje v podobě přirozené protilátky, ale nepatří mezi protilátky klinicky významné. [1, 10]

#### 4.1. Dědičnost Xg

Antigen Xg je dědičně vázán na X chromozomu jako dominantní znak. Xg(a+) fenotyp se nachází u 88,7 % žen a 65,6 % mužů. Ženy mohou mít formu heterozygotní Xg ( $Xg^a/Xg$ ) nebo homozygotní ( $Xg^a/Xg^a$ ). Muži mají pouze jeden chromozom X, proto jsou  $Xg^a$  hemizygoty ( $Xg^a/Y$ ) nebo mohou být Xg/Y. V tomto případě není  $Xg^a$  na erytrocytech exprimován. [1,2,3,9,10]

Tabulka 4: Frekvence fenotyp a genotypu u obou pohlaví. [1]

Fenotyp	Muži (%)	Ženy (%)
Xg(a+)	65,6	88,7
Xg(a-)	34,4	11,3
Genotyp		
$Xg^a/Xg^a$		0,434
$Xg^a/Xg$		0,450
$Xg/Xg$		0,116
$Xg^a/Y$	0,656	
Xg/Y	0,344	

#### 4.2. Antigeny Xg

Antigen CD99 je vytvářen MIC2 genem, který se nachází jak na chromozomu X, tak na chromozomu Y. CD99 antigen je přítomen na všech tkáňových buňkách. CD99 je na erytrocytech vyjádřen rozdílně. Expresí tohoto znaku je přímo spojená s přítomností či nepřítomností  $Xg^a$  antigenu. U ženského pohlaví je fenotyp Xg(a-) doprovázen sníženou expresí CD99. Překvapivě u mužského pohlaví fenotypu Xg(a-) je CD99 exprimován u 74 % mužů. Na základě incidence  $Xg^a$  a CD99 antigenů bylo objeveno, že strukturální gen kódující CD99 (MIC2) je úzce vázán s X chromozomem.  $Xg^a$  a CD99 jsou senzitivní k působení ficinu, papainu, trypsinu, bromelinu,  $\alpha$ -chymotrypsinu a pronázy. Jsou rezistentní na DTT a AET. [1,9,10]



## 5. SYSTÉM Scianna (Sc)

### 4.3. Protilátky systému Xg

Protilátka anti-Xg<sup>a</sup> se vyskytuje velice vzácně. Jedná se o přirozeně se vyskytující protilátku převážně typu IgG, méně již IgM. Tato protilátka je nejlépe detekovatelná při pokojové teplotě (i u typu IgG) a s pomocí nepřímého antiglobulinového testu. Protilátky anti-Xg<sup>a</sup> jsou podtřídy IgG1 a IgG2. Některé z nich mohou aktivovat komplement. Autoprotilátka anti-Xg<sup>a</sup> způsobuje závažnou hemolytickou anémii. Nejsou záznamy, že by aloprotilátka anti-Xg<sup>a</sup> způsobila HON či hemolytické potransfuzní reakce.

Protilátka anti-CD99 byla doposud detekována pouze ve dvou případech u japonských dárců krve. Protilátky reagovaly dobře v nepřímém antiglobulinovém testu a byly typu IgG.[1,3,4,9,10,]

## 5. SYSTÉM Scianna (Sc)

Systém se skládá ze sedmi antigenů (tabulka 4). Tyto antigeny se nacházejí na glykoproteinu ERMAP. Jedná se o antigeny: Sc1 (Sm), Sc2 (Bu<sup>a</sup>), Sc3, Sc4 (Rd), Sc5 (STAR), Sc6 (SCER) a Sc7 (SCAN). Sc1 a Sc2 jsou kodominantní antigeny. Sc1 a Sc3 jsou antigeny s vysokou frekvencí výskytu. Sc4 (Rd) je antigen s nízkou frekvencí výskytu. [1,2,11]

Tabulka 4: Seznam antigenů Scianna. [11]

Fenotyp	Běloši	Černoši
Sc:1,-2	99 %	100 %
Sc:1,2	1 %	0 %
Sc:-1,2	Velice vzácné	0 %
Sc:1,-2,4	Velice vzácné	Velice vzácné
Sc:1,2,4	Velice vzácné	0 %
Sc:1,-2,-5	Velice vzácné	0 %
Sc:-1,-2,-3 (Null)	Velice vzácné	0 %
Sc6	Vysokofrekventní	
Sc7	Vysokofrekventní	

### 5.1. Antigeny systému Scianna

#### 5.1.1. Antigeny Sc1 a Sc2

V roce 1962 Schmidt a spol. [11] identifikovali u pacientky (N.S.) protilátku, kterou určili jako protilátku proti antigenu s vysokou frekvencí výskytu, a pojmenovali ji anti-Sm. Následující rok Anderson a spol. [11] popsali protilátku proti antigenu s nízkou

## 5. SYSTÉM Scianna (Sc)

frekvencí výskytu a označili ji jako anti-Bu<sup>a</sup>. V roce 1964 poté Lewis a spol. [11] ve své studii zkoumali jejich příbuznost a zjistili, že Sm a Bu<sup>a</sup> jsou produkty stejného alelického genu. U těchto antigenů byla prokázána genetická nezávislost vůči ostatním skupinovým systémům a byly přejmenovány na Sc1 a Sc2.[1,11]

### 5.1.2. Antigen Sc3

McCreary a spol. [11] prvně popsali protilátku přítomnou v séru pacientky z Marshallových ostrovů v jižním Pacifiku. Jednalo se zřejmě o fenotyp Sc:-1,-2. Sérum pacientky reagovalo se všemi testovacími erytrocyty vyjma vlastních a její sestřenice, u které byl taktéž prokázán fenotyp Sc:-1,-2. Tyto výsledky vedly k názoru, že zde bude přítomna protilátka proti antigenu s vysokou frekvencí výskytu. Nason a spol. [11] tuto domněnku doložili objevem protilátky v séru bělošského muže, která byla reaktivní se všemi testovacími erytrocyty mimo vlastních a dvou již zmíněných erytrocytů Sc:-1,-2 Mikronézanů. Protilátka byla nazvána anti-Sc3 a odpovídající antigen Sc3. [1,11]

### 5.1.3. Radin antigen (Rd, Sc4)

V roce 1967 Rausen a spol. [11] popsali protilátku proti nízkofrekvenčnímu antigenu, jež byla nalezena u pěti žen, které porodily děti s HON. Protilátky byly detekovány na erythrocytech pupečnickové krve. Protilátka a antigen byly pojmenovány anti-Rd a Rd, podle jména rodiny Radin, u které tato protilátka byla poprvé popsána. V roce 1979 Lewis a Kaita [11] určili spojitost antigenu Rd se systémem Rh a jeho lokalizaci na chromozomu 1. V roce 2002 Wagner a spol. [11] potvrdili pomocí sekvenování kódovaného genu, že Rd antigen patří do skupinového systému Scianna a pojmenovali jej Sc4. [11] Rd antigen je děděn jako autozomálně dominantní znak. Nachází se převážně u ruských Židů, černochoů, Dánů a původních Američanů – Indiánů. [1,12]

### 5.1.4. STAR antigen (Sc5)

Skradski a spol. v roce 1982 [11] popsali protilátku, která byla nalezena u bělošského muže R.S. Tato protilátka reagovala se všemi testovacími erythrocyty, mimo jeho vlastních a erythrocytů jeho bratra, jehož erythrocyty byly otypovány jako Sc:-1,-2. V roce 2005 Devine a spol. [11] detailněji prozkoumali sérum pacientů s detekovanou neznámou protilátkou, kteří měli fenotyp Sc:-1,-2. Ve všech případech protilátka byla reaktivní se všemi testovacími erythrocyty. Protilátka nereagovala pouze s vlastními erythrocyty a erythrocyty fenotypu Sc:-1,-2,-3. Tuto protilátku dnes známe pod názvem STAR. [11,12,30]

### 5.1.5. SCER (Sc6) a SCAN (Sc7) antigeny

Tyto antigeny byly prokázány pomocí sekvenování ERMAP proteinu u dvou vzorků. Na ERMAP exonu 3 v pozici 242 byl zjištěn jednonukleotidový polymorfismus (SNP)

## 5. SYSTÉM Scianna (Sc)

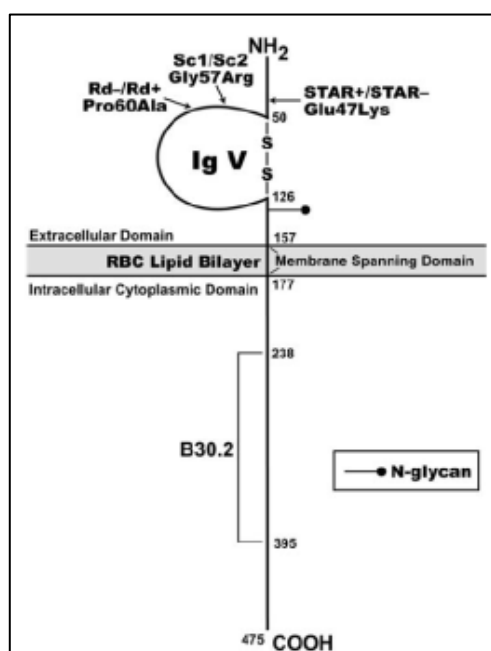
G>A, který kóduje Arg na Gln substitucí na kodonu 81. Na ERMAP exonu 3 na v pozici 103 byl zjištěn jednonukleotidový polymorfismus G>A, který je kódován pro substituci Gly 35Ser. Oba antigeny patří mezi vysokofrekventní antigeny. [12,30]

### 5.2. Vlastnosti SCIANNA glykoproteinu

Metodou imunoblotu erytrocytární membrány za účasti anti-Sc1 a anti-Sc2 bylo prokázáno, že antigeny Sc1 a Sc2 se nacházejí na glykoproteinu erytrocytární membrány o molekulové hmotnosti mezi 60 a 68 kD.

ERMAP je erytrocytární transmembránový adhezivní receptor. Tento protein je tvořen 475 aminokyselinami. Je součástí IgV a B30.2 domény velké imunoglobulinové rodiny (IgSF). Extracelulární doména se skládá z jedné smyčky IgV. ERMAP se vyskytuje na erytrocytárních buňkách, buňkách fetálních jater, kostní dřeni dospělého člověka, na retikulocytech a erytroblastech pupečnickové krve plodu. [11,12]

*Obrázek 2: ERMAP protein a polymorfismus Scianna systému. [11]*



### 5.3. Protilátky proti systému Scianna

Protilátky proti systému Scianna se objevují jen zcela vzácně. Znalost jejich klinické významnosti je tudíž velmi omezená. Nejlépe reagují v nepřímém antiglobulinovém testu a neaktivují komplement. Scianna protilátky jsou detekovány v podobě autoprotilátek.

## 5. SYSTÉM Scianna (Sc)

látky stimulované v těhotenství nebo jsou spojené s případným vznikem HON. [1,11,12]

V České republice byl v roce 2011 zaznamenán jeden případ detekce anti-Rd protilátky. Těhotenství 35-leté ženy provázali komplikace u jejího ještě nenarozeného potomka. U plodu během ultrazvukového vyšetření byl zaznamenán hydrops plodu a zvýšený průtok krve v arteria cerebri media. Byla naplánována intraumbilikální transfuze, která se nakonec neuskutečnila. Po porodu byl u novorozence detekován v pupečníkové krvi pozitivní přímý antiglobulinový test (viz kazuistika č. 2).

### Vliv enzymů a redukčních prostředků

Natrávení erytrocytů proteázami papainem, trypsinem a chymotrypsinem nemá vliv na reaktivitu protilátky proti systému Scianna. Ošetření pronázou a směsí trypsinu a chymotrypsinu snižuje jejich reaktivitu. Redukční prostředky AET a DTT výrazně snižují reaktivitu s antigeny systému Scianna. [1,11,12]

*Tabulka 6. Sumarizace charakteristik protilátek systému Scianna [11]*

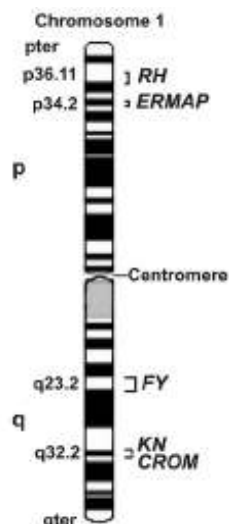
Protilátka	Vhodná metoda detekce	Aktivace komplementu	Třída imuno-globulinu	Transfuzní reakce	HON
Anti-Sc1	NAT	NE	IgG	Ne	Pouze PAT+
Anti-Sc2	NAT	NE	IgG	Ne	Středně těžké
Anti-Sc3	NAT	NE	IgG	Ne	Středně těžké
Anti-Sc4 (Rd)	NAT	NE	IgG	Ne	Středně těžké
Anti-Sc5 (STAR)	NAT	NEZNÁMO	IgG	Nereportováno	Nezaznamenáno
Anti-Sc6 (SCER <sup>®</sup> )	NAT	NEZNÁMO			Nezaznamenáno
Anti-Sc7 (SCAN)	NAT	NEZNÁMO			Nezaznamenáno

### **5.4. Molekulární základ SCIANNA systému**

Lewis a spol. [11] prokázali, že Sc a Rh se vyskytují na chromozomu 1p a jsou vzájemně propojeny. Noades a spol. [11] nezávisle zjistili genomické umístění SC lokusu na 1p34. ERMAP, gen kódující Sc glykoprotein je strukturován do 11 exonů v rozsahu 19kbp genomické DNA. Genetický základ SC polymorfismu byl určen sekvenováním ERMAP. Polymorfismus Scianna antigenů je založen na jednonukleotidové substituci ERMAP. [1,11,12]

## 6. SYSTÉM DOMBROCK

Obrázek 3: Genomické lokalizace ERMAP lokusu a jeho blízký vztah k Rh na chromozomu 1. [11]



Tabulka 7: Molekulární základ systému Scianna [30]

Antigen	Změna amino-kyseliny	Exon	Změna
Sc1/Sc2	Gly57Arg	3	169G>A
Rd-/Rd+	Pro60Ala	3	178C>G
STAR-/STAR+	Glu47Kys	3	139G>A
SCER	Arg81Gln	3	242G>A
SCAN	His26Tyr	2	76C>T
Sc <sub>null</sub>		2	54C>T 76C>T

## 6. SYSTÉM DOMBROCK

Skupinový systém Dombrock zahrnuje 2 kodominantní antigeny: Do<sup>a</sup> a Do<sup>b</sup> a pět vysokofrekvenčních antigenů: Gy<sup>a</sup>, Hy, Jo<sup>a</sup>, DOQY a DOMR. Tyto antigeny se nacházejí na glykoproteinu Dombrock, který je připojen k membráně erytrocytů prostřednictvím glykosylfosfatidylinositolové kotvy (GPI-kotva). Glykoprotein Dombrock patří do rodiny ADP-ribosyltransferázy. Gen DO (ART4) je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 12p13.2. Zaujímá 14kb a obsahuje 3 exony. [1,13]

### 6.1. Glykoprotein DOMBROCK

Molekulová hmotnost glykoproteinu je 47-58 kD. Vlastní protein se skládá z 314 aminokyselin a obsahuje signální sekvenci a motiv GPI-kotvy (viz obrázek 4C). Dále obsahuje pět potenciálních míst pro N-glykosylaci a 4-5 cysteinových zbytků.

Do glykoprotein je vyjádřen především na erytroidních buňkách kostní dřeně dospělého člověka a na buňkách fetálních jater. Lze jej detekovat ve slezině, lymfatických

## 6. SYSTÉM DOMBROCK

uzlinách, intestinu, ovariu a na varlatech. Do glykoprotein patří do skupiny mono-ADP-ribosyltransferáz. ADP-ribosyltransferáza katalyzuje přenos ADP-ribozy z NAD<sup>+</sup> na aminokyselinu cílového proteinu, který modifikuje příslušnou funkci proteinu. ADP-ribosylace (navázání ADP ribózy na protein) může být navrácena pomocí ADP-ribosylhydrolázy, která odštěpí ADP-ribózu a obnovuje funkci proteinu. To vede k domněnce, že Do může být spojován s regulací buněčné funkce proteinů. [13]

### 6.2. Antigeny DOMBROCK

#### 6.2.1. Do<sup>a</sup> a Do<sup>b</sup> (DO1 a DO2)

V roce 1965 Swanson a spol. [1] identifikovali protilátku v séru paní Dombrock anti-Do<sup>a</sup>. O osm let později Molthan a spol. [1] našli antitickou protilátku anti-Do<sup>b</sup>. Do<sup>a</sup> a Do<sup>b</sup> antigeny definují tři typy fenotypu, jejichž frekvence výskytu se liší u jednotlivých etnických skupin (viz tabulka 8).

#### 6.2.2. Gy<sup>a</sup> (DO3) a DOMBROCK null fenotyp

V roce 1967 byla Swansonem a spol. [1] popsána protilátka anti-Gy<sup>a</sup>. Tato protilátka byla detekována v séru ženy českého původu žijící v Americe. Antigen Gregory (Gy<sup>a</sup>) patří mezi vysokofrekvenční antigeny. Gy(a-) je děděn jako recesivní znak

Fenotyp Gy(a-) byl uznán jako null fenotyp systému Dombrock. V roce 1992 Banks a spol. [2] objevili, že erytrocyty Hy- a Jo(a-) také mají fenotyp Do(a-b-). Jedinci s Dombrock null fenotypem budou s nejvyšší pravděpodobností trpět onemocněním PNH III protože nemají GPI protein. [1,2]

#### 6.2.3. Hy (DO4)

Antigen Holley (Hy) [1] byl také prvně popsán v roce 1967. Schmidt a spol. [1] popsali protilátku anti-Hy, která byla určena v séru afroamerické ženy. [1] Moulds a spol. [1] rozpoznali fenotypovou příbuznost antigenů Hy a Gy<sup>a</sup>. Hy- černošská populace má slabý antigen Gy<sup>a</sup>, zatímco Evropané či Japonci s fenotypem Hy- jsou též Gy(a-). Je-li jedinec Gy(a-) Hy- naimunizován, vytváří protilátku anti-Gy<sup>a</sup>. Naproti tomu jedinci fenotypu Gy(a+<sup>w</sup>), Hy- vytváří protilátku anti-Hy. [1]

#### 6.2.4. Jo<sup>a</sup> (DO5)

Protilátka anti-Jo<sup>a</sup> byla popsána v roce 1972 Jensenem a spol. [1] Protilátka byla nalezena ve vzorku afroamerických jedinců. Byla prokázána fenotypová spojitost mezi antigeny Jo<sup>a</sup>, Gy<sup>a</sup> a Hy. Jelikož erytrocyty, které jsou Gy(a-) nebo Hy-, jsou též Jo(a-). [1]

## 6. SYSTÉM DOMBROCK

Tabulka 8: Skupinový systém Dombrock [13]

Fenotyp	Reaktivita s protilátkou anti-					Výskyt v %			
	Do <sup>a</sup>	Do <sup>b</sup>	Gy <sup>a</sup>	Hy	Joa	Běloši	Černoši	Japonci	Thajci
Do(a+b-)	+	0	+	+	+	18	11	1,5	0,5
Do(a+b+)	+	+	+	+	+	49	44	22	13
Do(a-b+)	0	+	+	+	+	33	45	76,5	86,5
Gy(a-)	0	0	0	0	0	Vzácné	Vzácné	Vzácné	Nenalezeno
Hy-	0	wk	wk	0	0/wk	Nenalezeno	Vzácné	Nenalezeno	Nenalezeno
Jo(a-)	wk	0/wk	+	wk	0	Nenalezeno	Vzácné	Nenalezeno	Nenalezeno

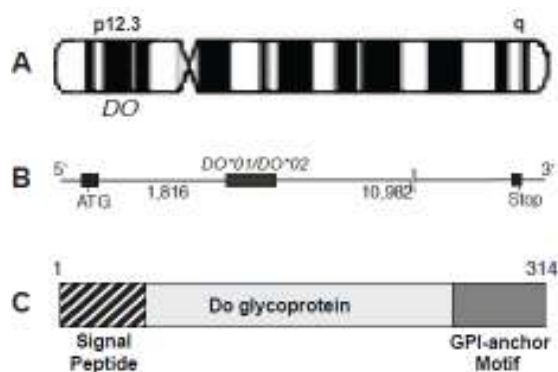
Do<sup>a</sup> a Do<sup>b</sup> jsou plně vyjádřeny na pupečnickových erythrocytech. Antigeny Jo<sup>a</sup>, Gy<sup>a</sup> a Hy jsou vyvinuty na erythrocytech pupečnickové krve slaběji.

Antigeny systému Dombrock jsou rezistentní vůči působení enzymu papainu či fici-nu. Naproti tomu systém Dombrock je citlivý na ošetření erythrocytů trypsinem, chymo-trypsinem a pronázou. Tyto enzymy buď zcela odštěpí antigeny či zapříčiní výraznou redukci jejich exprese. Dombrock antigeny jsou citlivé na AET a DTT, které poškozují disulfidické vazby. [1,13,14,15]

### 6.3. Molekulární genetika

Gen DO (ART4) je umístěn na krátkém raménku chromozomu 12. Zaujímá 14kB a skládá se ze tří exonů. Většina nukleotidových polymorfismů, které specifikují jednotlivé alely systému Dombrock, je uložena na exonu 2. [1,13,14]

Obrázek 4: (A) Lokalizace DO (12p12.3) na krátkém raménku chromozomu 12, (B) Uspořádání tří Do exonů, (C) Do protein se signální peptidem na aminovém konci a GPI-kotvou na karboxylovém konci.[13]



## 6. SYSTÉM DOMBROCK

### Do<sup>a</sup> a Do<sup>b</sup> (DO1 a DO2)

Tři běžné formy alel DO\*A a DO\*B se rozlišují ve třech nukleotidových pozicích na exonu 2. Dvě z nich jsou tzv. němé nukleotidové změny na 378C>T, Tyr126Tyr; 624T>C, Leu208Leu, ale třetí mutace způsobuje záměnu aminokyseliny 793A>G, Asn265Asp, která kóduje, v uvedeném pořadí, antigeny Do<sup>a</sup> a Do<sup>b</sup>.

Tři antigeny s vysokou frekvencí výskytu, Gy<sup>a</sup>, Hy a Jo<sup>a</sup> se nacházejí na Do polypeptidu a tento gen je exprimován u 99 % populace.

### Gy<sup>a</sup> (DO3)

Bylo zjištěno pět molekulárních alterací DO genu, které způsobují Do null (Gy<sup>a</sup>) fenotyp. Dvě z nich odpovídají za změnu v části sestřihu, která vede k vynechání exonu 2. Další zahrnuje jedince (probanda) s 8-nukleotidovou delecí uvnitř exonu 2, která způsobuje vytvoření předčasného stop kodonu. Výsledkem je, že dojde k vytvoření zkráceného proteinu, který neobsahuje ART motiv ani GPI-kotvu, které jsou nezbytné pro připojení na erytrocytární membránu. Čtvrtý molekulární vzor je změna v nukleotidu 442C>T, která vede ke změně Gln148 u stop kodonu exonu 2. Schází zde GPI-kotva. Pátý typ je nukleotidová změna zahrnující substituci jedné aminokyseliny (Phe62Ser), vedoucí k nepřítomnosti Do exprese na povrchu buněk.

### Hy<sup>a</sup> (DO4)

Transverze 323G>T na exonu 2 kóduje Hy+/Hy- fenotyp změnou Gly108Val. Jsou popsány dvě formy alel, které vedou ke vzniku Hy- fenotypu:

- 1) HY1, změna 323G>T (Gly108Val) s 898C>G (Leu300Val).
- 2) HY2, změna 323G>T (Gly108Val) s 898C (Leu300). Tento nukleotid je přítomen u alely kódující wild-typ Hy+.

### Jo<sup>a</sup> (DO5)

Vznik Jo(a+) či Jo(a-) fenotypu vede přes jednonukleotidovou záměnu 350C>T na exonu 2, která kóduje změnu aminokyselin Thr117Ile. Nukleotid 350T způsobuje nepřítomnost antigenu Jo<sup>a</sup>.

### DOYA (DO6) Antigen

DOYA+/DOYA- fenotyp vzniká důsledkem nukleotidové záměny 547T>G na exonu 2 vedoucí ke změně Tyr183Asp.

### DOMR (DO7) antigen

DOMR+/DOMR- fenotyp vzniká záměnou nukleotidů 431C>A a 432C>A, která vede ke změně aminokyselin Ala(GCC)144Glu(GAA). [1,9,13,14,15]



## 7. SYSTÉM COLTON

### 6.4. Protilátky systému DOMBROCK

#### 6.4.1. Anti-Do<sup>a</sup> a anti-Do<sup>b</sup>

Obě protilátky se velmi dobře detekují v nepřímém antiglobulinovém testu, nejlépe s ficinovanými či papainizovanými erytrocyty. Reaktivita je obvykle velice slabá. Nejčastěji jsou třídy IgG a neaktivují komplement. Dombrock protilátky nezpůsobují hemolytické onemocnění novorozence. Anti-Do<sup>a</sup> a anti-Do<sup>b</sup> mohou způsobit akutní i pozdní potransfuzní hemolytickou reakci.

#### 6.4.2. Anti-Gy<sup>a</sup>, -Hy a anti-Jo<sup>a</sup>

Anti-Gy<sup>a</sup>, -Hy a -Jo<sup>a</sup> jsou protilátky třídy IgG, nejlépe reagující v nepřímém antiglobulinovém testu a neaktivují komplement. Gy<sup>a</sup> je velice imunogenní. Bylo popsáno, že u všech Gy(a-) těhotných žen je vždy detekována anti-Gy<sup>a</sup> protilátka.

Prozatím není záznam o tom, že by tyto protilátky zapříčinily hemolytické onemocnění novorozence. Nicméně všechny mohou způsobit potransfuzní hemolytickou reakci.[1,2,3,4,5,13,14,15]

## 7. SYSTÉM COLTON

Skupinový systém Colton je relativně jednoduchý, co se týče antigenního složení. Skládá se z vysokofrekvenčního antigenu Co<sup>a</sup> a z antigenu s nízkou frekvencí výskytu Co<sup>b</sup>. Třetí antigen Co3 reprezentuje fenotyp Co(a-b-) neboli tzv. null fenotyp.

Co lokus se nachází na chromozomu 7p. Fenotyp Co(a-b-) je někdy spojován se získanou monozomií chromozomu 7. Antigeny Colton se nachází na proteinu aquaporin-1, který reguluje transport vody přes buněčnou membránu. [1,16]

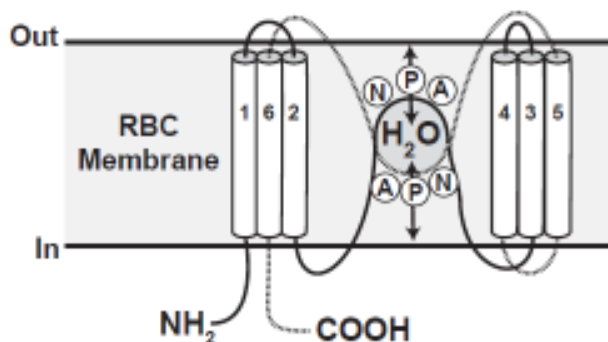
### 7.1. Glykoprotein COLTON, AQUAPORIN-1

V roce 1991, Preston a Agre [16] vyizolovali protein aquaporin-1 na membráně erytrocytů. Ten byl o tři roky později popsán jako nosič antigenů skupinového systému Colton. Aquaporin-1 (AQP1, CHIP, „Chanel-forming Integral Protein“) je integrální protein erytrocytů a buněčných membrán ledvin. Aquaporin-1 je schopen přenést  $3 \cdot 10^9$  molekul vody za vteřinu. Tento protein se též nachází na buněčné membráně buněk jater, žlučníku, oka a cévního endotelu. Je zařazen do rodiny tzv. hlavních vnitřních proteinů (MIP). MIP proteiny regulují transport malých molekul přes buněčné membrány u zvířat, rostlin i bakterií. Molekulová hmotnost neglykosylované formy je 28 kDa a glykosylované formy je 40 - 60 kDa. Jeden erytrocyt obsahuje mezi 120 000 až

## 7. SYSTÉM COLTON

160 000 molekul aquaporinu. Aquaporin tvoří tetramery (viz obrázek 5), přičemž každý tetramer obsahuje jednu glykosylovanou molekulu. [1,16]

*Obrázek 5: AQP1 kanál pro transport molekul vody. Kanálek, kterým dochází k transportu, má tvar připomínající přesýpací hodiny. AQP-1 je tvořen šesti transmembránovými doménami a křížením smyčky B a E s elektrostatickým polem vytváří NPA vzor, který formuje vodní kanál. [16]*



### 7.2. Antigeny systému Colton

#### 7.2.1. Antigeny Co<sup>a</sup> a Co<sup>b</sup> (Co1 a Co2)

V roce 1967 Heistö a spol.[1] pojmenovali protilátku anti-Co<sup>a</sup> (Colton), podle pacienta z Minneapolisu. Pacient se správně jmenoval „Calton“, ale jeho jméno bylo chybně přečteno ze štítku zkumavky. O tři roky později Giles a spol. [1] identifikovali antiteticou protilátku, anti-Co<sup>b</sup>.

Co<sup>a</sup> a Co<sup>b</sup> jsou rezistentní vůči působení enzymů papainu, trypsinu, chymotrypsinu a pronázy a také proti redukčnímu agens disulfidických můstků AET.

Co<sup>a</sup> nebyl zjištěn průtokovou cytometrií na lymfocytech, monocytech a granulocytech.

#### 7.2.2. Co3, Co (a-b-) fenotyp

V roce 1974 Rogers a spol. [1] identifikovali předpokládaný Colton null fenotyp. Fenotyp Co(a-b-) byl objeven u ženy původem z Kanady a u dvou ze čtyř jejích sourozenců. Její sérum obsahovala protilátku anti-Co3, která reagovala se všemi erytrocyty mimo erytrocytů fenotypu Co(a-b-). Co3 je také rezistentní vůči působení proteázy a AET. [1,2,4,16]

## 7. SYSTÉM COLTON

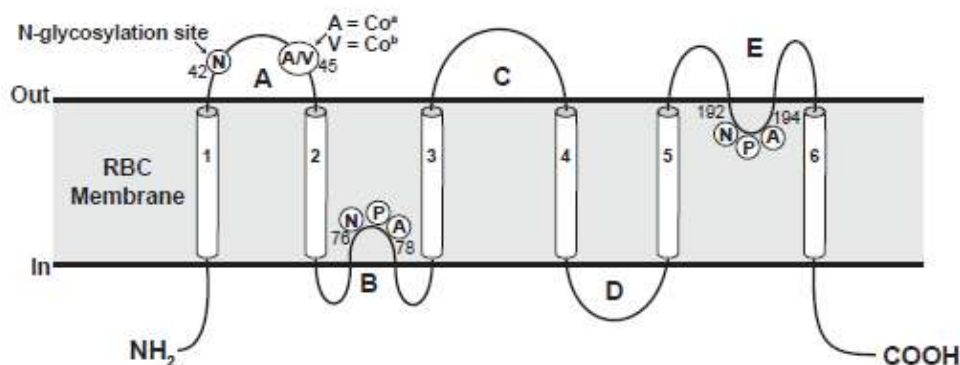
Tabulka 9: Výskyt antigenů skupinového systému Colton [16]

Antigen	Název	Frekvence výskytu	Fenotyp	Výskyt %
CO1	Co <sup>a</sup>	99,8 %	Co (a+b-)	91,4
CO2	Co <sup>b</sup>	8,6 %	Co (a-b+)	0,2
CO3	Co3	>99,99 %	Co (a+b+)	8,4
			Co (a-b-)	<0,01

### 7.3. Molekulární struktura

Colton antigeny vznikají jako výsledek polymorfismu AQP1 v extracelulární části smyčky A. Co<sup>a</sup>/Co<sup>b</sup> polymorfismus vychází ze změny aminokyseliny Ala45Val (Alanin pro Co<sup>a</sup>, Valin pro Co<sup>b</sup>), který je způsoben jednonukleotidovou substitucí C>T na pozici 134 exonu 1 genu AQP1. Colton glykoprotein je protein, který se skládá ze tří vnějších smyček a šesti membránových domén. Dále je tvořen dvěma cytoplazmatickými smyčkami, které mají -NH<sub>2</sub> i -COOH konce umístěné, na cytoplazmatické straně membrány. Molekulární základ Co(a-b-) Colton null fenotypu má několik odlišných molekulárních podkladů. [1,9,16]

Obrázek 6: Lineární diagram zobrazující Colton protein se šesti membránovými doménami s N- a C-terminálními vnitřními konci. Polymorfismus Co<sup>a</sup>/Co<sup>b</sup> je prokázán na 45. pozici. [16]



### 7.4. Colton antigeny a monozomie 7

Monozomie 7 je geneticky podmíněné onemocnění kostní dřeně. Jedná se o ztrátu jednoho chromozomu 7 v hemopoetických buňkách, které vede ke vzniku velice vzácné chromozomální abnormality. Tato abnormalita je spojena s akutní myeloidní leukémií a preleukemickým dysmyelopoetickým syndromem. Monozomie 7 je často propojena s fenotypem Co(a-b-), Co:-3 či detekcí velmi slabého antigenu Co(a+), fenotyp (Co(a+<sup>w</sup>b-) tzv. Co3- slabé erytrocyty.

## 8. SYSTÉM Landsteiner-Wiener

Zelinski a spol. [1] se domnívají, že absence Colton antigenů u některých případů monozomie 7 je výsledkem ztráty jedné alely. Pozměněná exprese produktů ostatních alel je doprovázena hematologickým onemocněním. [1]

### 7.5. Protilátek proti systému Colton

Protilátky systému Colton jsou především typu IgG. Nejlépe jsou detekovány pomocí nepřímého antiglobulinového testu s enzymaticky natrávenými erytrocyty. Některé protilátky proti systému Colton mohou aktivovat komplement. Byly zaznamenány případy vzniku pozdní i akutní potransfuzní hemolytické reakce a hemolytického onemocnění novorozence a plodu.

#### 7.5.1. Anti-Co<sup>a</sup>

Tato protilátka se vyskytuje relativně často. Anti-Co<sup>a</sup> způsobuje hemolytické onemocnění novorozence a akutní i pozdní formu těžkých potransfuzních hemolytických reakcí.

#### 7.5.2. Anti-Co<sup>b</sup>

Anti-Co<sup>b</sup> se vyskytuje relativně vzácně. Detekuje se ve spojitosti s přítomností dalších aloprotilátek. Může aktivovat komplement, což poté může vést ke vzniku akutní či pozdní potransfuzní hemolytické reakce.

Antigen Co<sup>b</sup> je na novorozeneckých erytrocytech již zcela exprimován. Přesto nebyl prozatím popsán žádný případ HON způsobený protilátkou anti-Co<sup>b</sup>.

#### 7.5.3. Anti-Co3

Protilátka anti-Co3 je zodpovědná za několik středně těžkých HON. Tyto protilátky jsou typu IgG1, IgG3 a i IgG2, aktivují komplement a působí hemolýzu. [1,2,4,9,16]

## 8. SYSTÉM Landsteiner-Wiener

### 8.1. Historie

LW (Landsteiner-Wiener) systém je především pozoruhodný svou historií. Landsteiner a Wiener naimunizovali králíky a morčata, kteří vytvářeli protilátku stejné specifity jako lidská anti-D protilátka. Následné experimenty prokázaly, že se nejednalo o anti-D protilátku. Pomocí adsorpce byla tato protilátka navázána na D+ erytrocyty a tudíž se nemohlo jednat o protilátku anti-D. Po určitý čas byla tato protilátka vedena jako „anti-D-like“ protilátka a teprve později byla přejmenována na anti-LW.

## 8. SYSTÉM Landsteiner-Wiener

Přestože se jedná o odlišné antigeny, LW a D antigeny jsou fenotypově příbuzné. U D+ erytrocytů je vyjádřen LW antigen silněji než u D- erytrocytů, proto je anti-LW protilátka snadno zaměnitelná s anti-D. Gibbs [1] dále prokázal, že síla LW antigenu se odráží od síly D antigenu: DcE/DcE erytrocyty mají silnější antigen D i LW než erytrocyty DcE/dce. Rh<sub>null</sub> erytrocyty, kdy není exprimován žádný z Rh antigenů, nemají také antigen LW. [1,2,3,6,9]

### 8.2. Antigeny LW

Systém LW se skládá ze tří antigenů: LW<sup>a</sup>, LW<sup>ab</sup> a LW<sup>b</sup>. Nachází se na LW glykoproteinu (ICAM-4). ICAM-4 je intracelulární adhezivní molekula. LW glykoprotein je kódován genem LW, který se nachází na chromozomu 19 v pozici 13.3.

LW<sup>a</sup> a LW<sup>b</sup> jsou kodominantní antigeny. Vznikají na základě jednonukleotidové substituce na LW genu (308A>G), která vede ke změně aminokyseliny na LW glykoproteinu (Gln70Arg).

LW<sup>a</sup> a LW<sup>ab</sup> jsou antigeny s vysokou frekvencí výskytu, LW<sup>b</sup> antigen je antigen s nízkou frekvencí výskytu. Nejvyšší výskyt LW<sup>b</sup> antigenů byl zaznamenán v Pobaltí u Lotyšů a Litevců.

Tabulka 10: Antigeny systému LW

ISBT	Název	Historický název	Výskyt (bělošská populace)	Pozn.
LW5	LW <sup>a</sup>	LW, Rh25	>99 %	
LW6	LW <sup>ab</sup>	LW <sub>1</sub> , LW <sub>2</sub> , LW <sub>3</sub>	>99 %	
LW7	LW <sup>b</sup>	Ne <sup>a</sup>	>1 %	8 % Estonců, 6 % Finů, 4 % Poláků

Fenotyp LW (a-b-) se objevuje velmi vzácně. Jedinci s RH<sub>null</sub> fenotypem také nemají antigen LW.

Exprese antigenu LW může být přechodně utlumena během těhotenství a při různých onemocněních např. Hodgkinova choroba, lymfom a leukemie. [1,9]

#### Vliv enzymů a redukčních činidel

Antigeny LW systému jsou rezistentní vůči působení enzymů ficinu, papainu nebo trypsinu. Disulfidické vazby jsou narušeny působením DTT a AET.

## 9. SYSTÉM GERBICH

### 8.3. ICAM-4 glykoprotein

ICAM-4 glykoprotein je intracelulární adhezivní molekula, patřící do velké imunoglobulinové rodiny IgSF. ICAM-4 je ligandem pro integrin, pozdní antigen-4 (VLA-4) na hemopoetických buňkách a pro  $\alpha_v$  integriny na nehemopoetických buňkách. ICAM-4 se nachází pouze na erytroidních buňkách a s velkou pravděpodobností i na buňkách placenty. [1]

### 8.4. LW protilátky

Protilátky proti tomuto systému jsou obvykle typu IgG a jsou snadno detekovatelné pomocí antiglobulinového testu. Neaktivují komplement, nezpůsobují hemolýzu ani HON. Protilátky proti systému LW patří mezi klinicky málo významné protilátky až protilátky klinicky nevýznamné. [1,2,3,4,5,9]

## 9. SYSTÉM GERBICH

Antigeny systému Gerbich jsou exprimovány na glykoforinu C (GPC) a glykoforinu D (GPD), které jsou kódovány jedním genem GYPC. Tento systém se skládá ze šesti antigenů s vysokou frekvencí výskytu (Ge2, Ge3, Ge4, GEPL[Ge10], GEAT [Ge11], GETI [Ge12] a z pěti antigenů s nízkou frekvencí výskytu (Wb [Ge5], Ls<sup>a</sup> [Ge6], An<sup>a</sup> [Ge7], Dh<sup>a</sup> [Ge8] a GEIS [Ge9]).

Systém Gerbich byl prvně popsán Rosenfieldem a spol. v roce 1960. [1] Název dostal podle jedné z žen (pí Gerbich), u níž byla v séru zachycena protilátka proti tomuto antigenu.

V systému Gerbich se nacházejí tři vzácné fenotypy. Základ takového fenotypu spočívá v erytrocytech, které neobsahují jeden či více vysokofrekvenčních antigenů Gerbich: Ge:-2, 3, 4 (Yus fenotyp), Ge: -2, -3, 4 (Gerbich fenotyp), které vznikají delecí exonu 2 a exonu 3 genu GYPC. Třetí vzácný fenotyp Ge: -2.-3.-4 (Leach nebo Ge-null fenotyp) vzniká delecí exonů 3 a 4. [1,17]

### 9.1. Biochemie

#### Glykoforin

Glykoforin je glykoprotein s vysokým množstvím kyseliny sialové („sialic acid“). Hlavní sialoglykoproteiny jsou glykoforin A (GPA) a glykoforin B (GPB), které mají homologickou strukturu a jsou nosiči MNSs systému. Minoritní glykoproteiny glykoforin C

## 9. SYSTÉM GERBICH

(GPC) a glykoforin D (GPD) jsou dalším párem s homologickou strukturou. GPC a GPD fungují jako nosiče pro Gerbich systém. Mezi glykoforiny A a B a glykoforiny C a D není žádná genetická příbuznost. Jsou produkovány nezávislými geny odlišných chromozomů.

### GPC a GPD

Glykoforin C a glykoforin D jsou s erytrocytární membránou propojeny přes proteiny 4.1R a p55. Oba glykoforiny se skládají ze tří domén: extracelulární -NH<sub>2</sub> domény, transmembránové domény a intracelulární cytoplazmatické -COOH domény. GPC i GPD jsou kódovány genem GYPC. Glykoforin C je kódován, pokud translace začíná prvním AUG kodonem. Je-li použit v sekvenci nukleotidu druhý AUG kodón, vzniká glykoforin D. GPD je kratší verze glykoforinu GPC. Aminokyselinový řetězec GPD je téměř identický s GPC, pouze GPD je kratší o 21 aminokyselin v N-terminální části GPC.

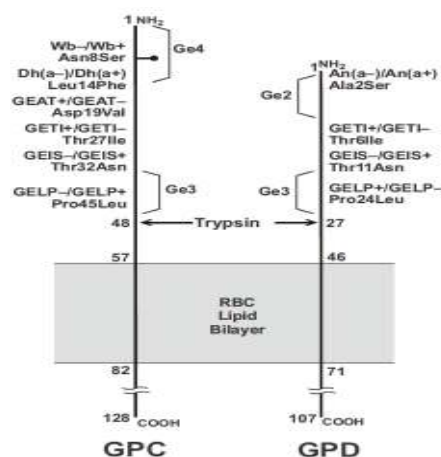
Na GPC glykoforinu jsou prokazovány antigeny Ge4, Wb, Dh<sup>a</sup>, GEAT. Naproti tomu na GPD se vyskytují dva antigeny Ge2 a An<sup>a</sup>. Ostatní antigeny systému Gerbich jsou vyjádřeny na obou glykoforinech.

GPC se podílí na zachování tvaru erytrocytů a pomocí proteinu 4.1R reguluje vlastnosti membrány. Protein p55, periferní protein lidské membrány erytrocytů, je propojen v přesně definovaném místě s komplexem proteinu 4.1R-GPC, který tvoří spojkou s cytoskeletem membrány.

Nepřítomnost GPC a GPD má spojitost s dědičně podmíněnou eliptocytózou. [1,2,3,6,17]

*Obrázek 7: Umístění antigenů Gerbich na glykoforinu C a glykoforinu D. [17]*

*Štěpící místo trypsinu.*



### 9.2. Molekulární genetika a dědičnost

Gen GYPC je umístěn na chromozomu 2 v oblasti q14 - q21. Antigeny Gerbich jsou děděny jako autozomálně dominantní znaky. Gen se skládá z 13,5 párů kb a je tvořen čtyřmi exony. Exony 2 a 3 jsou homologické s méně jak 5 % nukleotidovou rozdílností, což může vést během meiosis k nerovnoměrnému crossing-overu a ztrátě exonů 2 a 3. Ke vzniku deficiencie Gerbich systému dochází delecí přibližně 3kb GYPC genu. Vzniká tak fenotyp Yus (Ge: -2, 3,4) nebo fenotyp Gerbich (Ge: -2,-3,4). Fenotypu Yus schází exon 2 a naopak fenotypu Gerbich exon 3. Fenotyp Leach (Ge: -2,-3,-4) vzniká na základě dvou rozdílných genetických podkladů. Typ „PL“ Leach fenotypu je podmíněn delecí exonů 3 a 4 genu GYPC. Typ „LN“ vzniká jako výsledek jednonukleotidové změny 131G>T (134delC na exonu 3; Trp44Leu), která vede k předčasnému vzniku stop kodonu. [1,17]

### 9.3. Antigeny Gerbich

#### Vysokofrekventní antigeny

Antigen Ge2 není přítomen na erytrocytech fenotypu Yus, Gerbich a Leach. Nachází se u -NH<sub>2</sub> terminálního konce GPD. Na GPC vyjádřen není.

Antigen Ge3 není přítomen na erytrocytech fenotypu Gerbich a Leach. Je přítomen jak na GPC tak i GPD na transmembránové části lipidové dvouvrstvy.

Antigeny Ge2 a Ge3 jsou detekovány na erytrocytech pupečnickové krve.

Antigen Ge4 není přítomen na erytrocytech fenotypu Leach. Tento fenotyp je pokládán za null fenotyp Gerbich systému. Ge4 se nachází na -NH<sub>2</sub> terminálním konci GPC.

Zbývající tři vysokofrekventní antigeny systému Gerbich: GEPL (Ge10), GEAT (Ge11) a GETI (Ge12), které vznikají následkem nukleotidové změny v GYPC (viz tabulka 11).

#### Nízkofrekventní antigeny

Antigeny Wb (Ge5, Webb), Ls<sup>a</sup> (Ge6, Lewis), An<sup>a</sup> (Ge7, Ahonen), Dh<sup>a</sup> (Ge8, Duch) a GEIS (Ge9) jsou výsledkem nukleotidových změn GYPC genu (viz tabulka 11).

Wb (Ge5, Webb) antigen vzniká v důsledku substituce Asn8Ser blízko -NH<sub>2</sub> terminálního konce GPC.

Ls<sup>a</sup> (Ge6, Lewis) vzniká následkem nově vytvořené aminokyselinové sekvence kódované zdvojnásobením nebo ztrojnásobením exonu 3 genu GYPC. [1,17]



## 9. SYSTÉM GERBICH

Tabulka 11: Gerbich fenotypy a antigeny[17]

Fenotyp	Název	Nukleotidová změna/exon/intron	Změna aminokyseliny	Etnický výskyt
GE:-2,3,4	Yus fenotyp	Delece exonu 2	Delece aminokyseliny, změna GPC	Hispanci, Izraelci a středomořská populace
GE:-2.-3,4	Gerbich fenotyp	Delece exonu 3	Delece aminokyseliny, změna GPC	Melanézané
GE:5	Wb+	23A>G na exonu 1	Asn8Ser na GPC	Velšané a Australané
GE:6	Ls(a+)	Duplikace/Triplikace exonu 3	Duplikace, pozměněný GPC	černoši (2 %), Finové (1.6 %)
GE:7	An(a+)	67G>T na exonu 2	Ala23Ser GPC, Ala2Ser na GPD	Finové (0.02 %)
GE:8	Dh(a+)	40C>T na exonu 1	Leu14Phe na GPC	Dán
GE:9	GEIS+	95C>A na exonu 2	Thr32Asn na GPC Thr11Asn na GPD	Japonci
GE:-10	GEPL-	134C>T na exonu 3	Pro45Leu na GPC Pro24Leu na GPD	vzácné
GE:-11	GEAT-	56A>T na exonu 2	Asp19Val na GPC	vzácné
GE:-12	GETI-	80C>T na exonu 2	Thr27Ile na GPC Thr6Ile na GPD	vzácné

### Pozměněná exprese antigenů

Není-li na erythrocytech protein 4.1R přítomen, jsou Gerbich antigeny exprimovány slabě. Jelikož GPC a GPD interagují s proteinem 4.1R, nepřítomnost tohoto proteinu má za následek snížené množství těchto glykoforinů v erythrocytární membráně. S Gerbich negativními erythrocyty souvisí rozdílná síla dalších antigenů, např. Kell a Vel.

### **9.4. Protilátky proti systému Gerbich**

#### Anti-Ge2

Tato protilátka může být jak imunně tak i přirozeně se vytvářející protilátkou a reaguje s antigenem na GPD. Anti-Ge2 protilátka typu IgG je nejlépe zachycena v NAT. Některé protilátky anti-Ge2 mohou aktivovat komplement a způsobovat hemolýzu. U erythrocytů natrávených papainem či ficinem dochází ke ztrátě reaktivity. Protilátku anti-Ge2 mohou vytvářet jedinci fenotypu Yus, Gerbich a Leach.

## 9. SYSTÉM GERBICH

### Anti-Ge3

Protilátka anti-Ge3 reaguje s antigeny jak na GPC tak i GPD. Anti-Ge3 je obvykle typu IgG, která dobře reaguje v NAT. Byl rovněž zaznamenán typ IgM. Protilátka anti-Ge3 aktivuje komplement a způsobuje hemolýzu erytrocytů. Anti-Ge3 reaguje s erytrocyty natrávenými papainem či ficinem. Tuto protilátku vytvářejí jedinci fenotypu Gerbich nebo Leach.

### Anti-Ge4

Aloprotilátka anti-Ge4 se vyskytuje velice vzácně. Je typu IgG a reaguje v NAT testu. Není reaktivní s erytrocyty natrávenými enzymy papainem či ficinem. Anti-Ge4 mohou vytvářet pouze jedinci fenotypu Leach.

### Protilátky proti antigenům s nízkou frekvencí výskytu

Protilátky proti antigenům s nízkou frekvencí výskytu jsou typu IgG či IgM a mohou být detekovány také jako přirozeně se vyskytující protilátky. Reagují při pokojové teplotě v solném prostředí v metodě NAT. Tyto protilátky neaktivují komplement a nejsou reaktivní s erytrocyty natrávenými papainem či ficinem. Dosud nebylo zaznamenáno, že by způsobovaly potransfuzní hemolytickou reakci či hemolytické onemocnění novorozence a plodu. [1,17]

### Klinická významnost

Protilátky anti-Ge2 i anti-Ge3 mohou způsobovat lehkou akutní i pozdní potransfuzní reakci. Protilátky proti antigenům Gerbich byly eluovány z PAT pozitivních erytrocytů. Anti-Ge2 nezpůsobují hemolytické onemocnění novorozence a plodu. Naproti tomu protilátka anti-Ge3 může HON způsobit. Bylo zaznamenáno několik případů autoimunitní hemolytické anémie způsobené autoprotiilátkami anti-Ge.

## **9.5. Hereditární eliptocytóza**

Gerbich antigeny interagují s proteinem 4.1R, který přispívá ke stabilizaci erytrocytární membrány. V roce 1986 Daniels a spol. [1] popsali rodinu s dědičně podmíněnou eliptocytózou, která byla spojena s fenotypem Leach. V roce 1991 Telen a spol. [1] určili molekulární podklad eliptocytózy jako deficit GPC a GPD, který je spojen právě s fenotypem Leach.

## 10. SYSTÉM CROMER

### 9.6. Malárie

V severní Papui Nové Guinei, která je endemickou oblastí pro malárii, byl zjištěn případ, kdy Gerbich negativní pacient nebyl infikován *Plasmodium falciparum* a *Plasmodium vivax*. Následná studie potvrdila, že *P. falciparum* je transportováno do erytrocytů přes receptor „wild-type“ GPC, který právě schází na Gerbich negativních erytrocytech. [1, 17]

## 10. SYSTÉM CROMER

Antigeny skupinového systému Cromer jsou umístěny na tzv. rozpadovém akceleračním faktoru *Decay Accelerating Factor* (DAF nebo CD55). Jedná se o 70kDa velký membránový protein, který reguluje systém komplementu na povrchu buněk prostřednictvím zrychlení disociace C3 konvertázy. Tento glykoprotein je připojen k membráně erytrocytu prostřednictvím glykosylfosfatidylinositolové kotvy (GPI).

V současné době je známo 11 antigenů systému Cromer. Osm z nich jsou antigeny s vysokou frekvencí výskytu a tři antigeny s nízkou frekvencí výskytu (tabulka 12). [1,18]

Tabulka 12 Antigeny krevně skupinového systému Cromer [18]

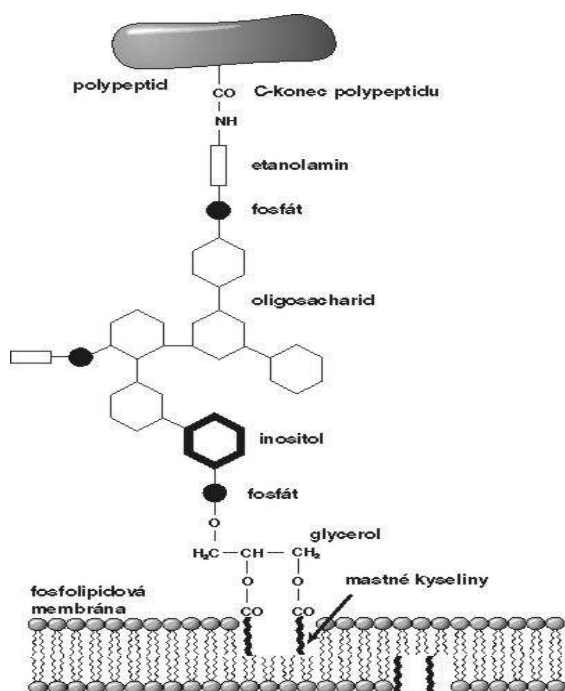
ISBT označení	Jméno antigenu	Frekvence	Záznam o detekci protilátky	Etnická spojitost
021001	Cr <sup>a</sup>	>99 %	Mnoho	Cr(a-) u černochoů; 1 Španělský američan
021002	Tc <sup>a</sup>	>99 %	Mnoho, málo	Tc(a-) černoši Tc(a-) běloši
021003	Tc <sup>b</sup>	Černoši 6 %	Málo	Tc(b+) černoši
021004	Tc <sup>c</sup>	<0,01 %	Málo	Tc (c+) běloši
021005	Dr <sup>a</sup>	99,99 %	Několik	Dr(a-) Uzbenikánský židi a Japonci
021006	Es <sup>a</sup>	99,99 %	Málo	Žádná spojitost
021007	IFC	100 %	Několik	3 Japonci 2 Italští Američané 1 Židovský Američan
021008	WES <sup>a</sup>	Většina populace 0,01 % Afroameričani 0,48 % Finové 0,56 %	Několik	WES (a+) Finové a Černoši
021009	WES <sup>b</sup>	100 %	Málo	WES (b-) Finové a Černoši
021010	UMC	100 %	málo	Japonci
021011	GUTI	100 %	Málo	GUTI- u Číňanů

### 10.1. PROTEIN DAF NOSIČ a SKUPINOVÝ SYSTÉM CROMER

DAF je vnitřní membránový jednořetězcový glykoprotein, který je exprimován na erytrocytech, granulocytech, trombocytech, lymfocytech a na dalších buňkách těla. V solubilní formě se nachází v plazmě a tělesných tekutinách.

DAF je součástí skupiny glykoproteinů, které jsou přichyceny na buněčné membráně pomocí GPI- kotvy. [1,18]

Obrázek 8: Struktura GIP kotvy [28]

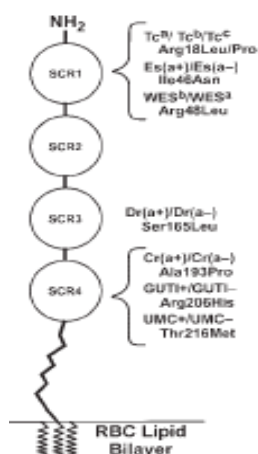


Fosfatidylinositol(PI) je zabudován v lipidové dvouvrstvě buněčné membrány. Uprostřed je umístěný oligosacharidový řetězec, který se váže na jedné straně na C6 hydroxyl inositol a na straně druhé přes fosfátovou skupinu ethanolaminu na amidovou vazbu. Oligosacharid se vyskytuje obvykle jako tetrasacharidový řetězec tvořený manózou a glukózou.[28] DAF chrání buňky před poškozením tím, že inhibuje aktivovaný komplement. DAF inhibuje C3 konvertázu, která urychluje štěpení C4b2a a C3bBb u klasické i alternativní cesty aktivace komplementu.

DAF je receptorem pro *Escherichia coli*, *Echovirus* a *Coxsackievirus*.

Gen DAF glykoproteinu je prokázán na chromozomu 1. DAF tvoří 381 aminokyselin. (viz obrázek 9) [1,2,3,18]

## 10. SYSTÉM CROMER



Obrázek 9: Schématické znázornění glykoproteinu DAF a umístění jednotlivých antigenů systému Cromer. [18]

### 10.2. Charakteristika antigenů a protilátek systému CROMER

#### 10.2.1. Cr<sup>a</sup> (CROM1)

Antigen Cromer byl poprvé popsán McCormicem a spol. [18] v roce 1965. Protilátka anti-Cr(a) byla detekována u těhotné černošské ženy, podle níž byl později tento krevně skupinový systém pojmenován. Vzorek její plazmy reagoval se všemi testovacími erytrocyty, mimo vlastních a jejích dvou sourozenců. Kromě jednoho příkladu protilátky anti-Cr<sup>a</sup>, která byla nalezena v séru americké ženy s původem ze Španělska, se tato protilátka nalézá především v černošské populaci. Přestože vznik protilátky anti-Cr<sup>a</sup> je stimulován především těhotenstvím, nebyl nikdy zaznamenán případ hemolytického onemocnění novorozence a plodu (HON).

Dle Mendlových zákonů dědičnosti je antigen Cr(a) děděn jako dominantní znak.

Molekulární základ fenotypu Cr(a-) je v nukleotidové mutaci, 679G>C na exonu 6, který kóduje aminokyselinu nahrazením Ala193Pro v SCR4 DAF glykoproteinu.

#### 10.2.2. Tc<sup>a</sup> (CROM2), Tc<sup>b</sup> (CROM3), Tc<sup>c</sup> (CROM4)

Tc<sup>a</sup>, antigen s vysokou frekvencí výskytu, byl prvně popsán v roce 1980. Protilátka byla nalezena v séru dvou černošských žen s iniciálami GT a DLC. Ani jedné z těchto žen nebyla podána krevní transfuze. S největší pravděpodobností vznik protilátky byl u těchto žen stimulován těhotenstvím. Nebylo zaznamenáno HON. Antigen, proti kterému byla nalezena protilátka v séru GT a DLC, byl pojmenován spojením dvou písmen z iniciálu dvou černošských žen Tc.

Tc<sup>b</sup>, antigen s nízkou frekvencí výskytu, byl zjištěn detekcí protilátek, když erytrocyty Tc(a-) pacienta WM reagovali se čtyřmi séry obsahující anti-Go<sup>a</sup>. Po adsorpci anti-Go<sup>a</sup> protilátky bylo sérum dále reaktivní se šesti vzorky erytrocytů, které byly náhodně vy-

## 10. SYSTÉM CROMER

brány od černošských dárců krve. Výskyt Tc<sup>b</sup> antigenu bylo přibližně zjištěno u 5 % černošské populace. Tc(b+) antigen nebyl prozatím prokázán v bělošské populaci.

Tc<sup>c</sup> je antigen s nízkou frekvencí výskytu. Protilátka byla detekována v séru bělošské dívky (iniciály DWL). U této dívky a její sestry byl prokázán fenotyp Tc(a-b-).

Analýzou DAF glykoproteinu pomocí cDNA bylo prokázáno, že Tc<sup>a</sup> antigen se nachází na CCP-1 DAF proteinu. U nukleotidu 155 dochází k substituci G na T a G na C. Ten kóduje Arg18Leu a Arg18Pro, u kterých dochází u Tc<sup>b</sup> a Tc<sup>c</sup> expresi antigenu (tabulka 13).

### 10.2.3. Dr<sup>a</sup> (CROM5)

Dalším antigenem, který patří do systému Cromer, je antigen s vysokou frekvencí výskytu – Dr<sup>a</sup>. Tento antigen byl identifikován v roce 1984 u Izraelské ženy (MD) bulharského původu. Sérum pacientky bylo kompatibilní s erytrocyty sestry, jejíž sérum taktéž obsahovalo protilátku s identickou specificitou. Obě ženy měly za sebou více než jedno těhotenství a byly jim podány transfuze. Erytrocyty u obou sester vykazovaly slabou expresy antigenu Cr<sup>a</sup> a Tc<sup>a</sup>. Prokázalo se, že protilátka je odlišná od anti-Cr<sup>a</sup> a anti-Tc<sup>a</sup> a byla pojmenována anti-Dr<sup>a</sup>, po izraelské ženě MD. Dále byly popsány dva stejné příklady zachytu protilátky anti-Dr<sup>a</sup> u nepříbuzných jedinců též původu uzbekistánských Židů. U těchto případů též byla prokázána slabá exprese antigenů Cr<sup>a</sup> a Tc<sup>a</sup>.

Fenotyp Dr(a-) byl taktéž popsán v japonské populaci. Daniels a spol. [18] zaznamenali protilátku anti-Dr<sup>a</sup> v séru dárkyně krve, která porodila dvě děti a nebyla jí podána transfuze. Uchikawa a spol. sepsali další případ Dr(a-) fenotypu, který byl prokázán u dalšího japonského dárce krve.

Molekulární základ je stejný jak pro Izraelity tak pro Japonce. Bodová mutace 596C>T mění Ser165Leu.

Dr antigen je receptor pro fimbrie 075X adhezivní *E.coli*, organismus, který vyvolává infekce močového traktu, cystitidy a chronické diarey.

### 10.2.4. Es<sup>a</sup> (CROM6)

Do současné doby jsou v literatuře popsány pouze dva případy protilátky anti-Es<sup>a</sup> a jsou známy dva jedinci Es(a-). Tato protilátka byla prvně zachycena v séru ženy mexického původu. Vzorek jejího séra byl reaktivní se všemi testovacími erytrocyty. Též byla detekována u afroamerického muže.

## 10. SYSTÉM CROMER

Es<sup>a</sup> antigen se nachází na CCP-1 DAF glykoproteinu. Sekvenováním DAF exonu 2 se prokázala transverze u T239A kódující Ile46Asn substituci aminokyselin, která se nachází velice blízko u substituce Leu48Arg zodpovědné za polymorfismus antigenu WES<sup>b</sup>/WES<sup>a</sup>. Tato blízkost vysvětluje serologickou interakci mezi Es<sup>a</sup> a WES<sup>b</sup>.

### 10.2.5. IFC (Inab fenotyp) (CROM7)

Daniels a spol. [18] v roce 1982 popsali protilátku (Inab), která byla detekována u japonského muže. Tato protilátka byla reaktivní se všemi erytrocyty, včetně erytrocytů jeho matky, otce a bratra. Erytrocyty pacienta z Japonska byly prokázány jako null fenotyp systému Cromer.

Lidské erytrocyty, u kterých byl prokázán tento vzácný fenotyp, jsou DAF deficientní, ale ostatní GPI-membránové glykoproteiny jsou přítomny. Do současnosti byl tento vzácný fenotyp identifikován u šesti lidí: u tří Japonců, jednoho amerického Žida a bratra se sestrou – Američanů s italským původem.

Séra pacientů s Inab fenotypem byla reaktivní s náhodně vybranými testovacími erytrocyty, včetně erytrocytů, které neobsahují běžné antigeny systému Cromer Cr<sup>a</sup>, Tc<sup>a</sup>, Dr<sup>a</sup>, Es<sup>a</sup>, WES<sup>b</sup> a UMC. Protilátka byla pojmenována anti-IFC. Erytrocyty Inab fenotypu jsou IFC negativní.

Molekulární základ fenotypu Inab byl určen u tří japonských pacientů. U dvou z nich byla prokázána bodová mutace 261G>A, která vede ke změně Trp53 u stop kodonu. U třetího Japonce vytváří bodová mutace 263C>A kryptický splicing na exonu 2. To způsobuje 26-bp delecii a mění se čtecí rámec. Následkem je změna Ser54 ve stop kodonu. Ve všech případech tyto změny vedou k tomu, že se na membráně erytrocytů nenachází DAF protein.

DAF protein je důležitý v ochraně erytrocytárních membrán proti autolýze způsobené aktivací komplementu. Přesto se zjistilo, že u pacientů s tzv. IFC - a Dr(a-) erytrocyty, které nemají protein DAF nebo tento protein je význačně redukován, nemá sklon k in vitro lýze. Spojitost stability erytrocytů se výrazně srovnává s erytrocyty lidí, kteří jsou postiženi PNH. PNH III erytrocyty mají deficienci GPI spojovacího glykoproteinu, jehož je DAF glykoprotein součástí. [18]

### 10.2.6. WES<sup>a</sup> (CROM8), WES<sup>b</sup>(CROM9)

WES<sup>a</sup> antigen, antigen s nízkou frekvencí výskytu. Tento antigen byl popsán v roce 1987 ve finské populaci s frekvencí výskytu kolem 0,6 %. Protilátka byla poprvé de-

## 10. SYSTÉM CROMER

tekována ve vzorku 77-leté ženy během rutinního testu kompatibility. Rodinná studie prokázala, že tento antigen je děděn jako autozomálně dominantní znak.

WES<sup>b</sup> je naproti tomu antigenem s vysokou frekvencí výskytu. Daniels a spol. [18] prokázali u černošské ženy (Wash) protilátku anti-WES<sup>b</sup>. WES<sup>b</sup> se nachází na CCP-1.

Molekulární základ antigenů WES<sup>a</sup> a WES<sup>b</sup> prokazuje, že antigeny jsou kódovány pomocí jednoho nukleotidu odlišného v kodonu 48. Bodová mutace 245G>T zdravého typu DAF neexprimuje WES<sup>b</sup> antigen, ale vyjadřuje WES<sup>a</sup>.

### 10.2.7. UMC (CROM10)

UMC, další z antigenů s vysokou frekvencí výskytu skupinového systému, byl objeven v roce 1989. Jediný popsáný případ protilátky anti-UMC byl detekován v séru japonské dárkyně krve. Této ženě nebyla nikdy podána krevní transfuze, nicméně porodila tři děti. Protilátka je reaktivní se všemi testovanými panelovými erytrocyty.

Molekulární základ UMC- fenotypu byl prokázán pomocí jednonukleotidového polymorfismu, substituce 749C>T, kóduje Thr216Met na SCR4 glykoproteinu DAF.

### 10.2.8. GUTI

Protilátka proti GUTI antigenu byla objevena v roce 1989 v séru Kanadského dárce chilského původu. Protilátka anti-GUTI byla silně reaktivní se všemi panelovými erytrocyty běžného fenotypu.

Molekulární analýza krve dárce zjistila polymorfismus 719G>A v DAF, který odpovídá změně aminokyseliny Arg206His v SCR4 DAF antigenu.[1,18,19]

*Tabulka 13: MOLEKULÁRNÍ ZÁKLAD ANTIGENŮ [1]*

Antigen	Substituce AMK	Exon	Nukleotidová mutace
Cr(a+)/Cr(a-)	Ala193Pro	6	679G>C
Tc <sup>a</sup> /Tc <sup>b</sup>	Arg18Leu	2	155G>T
Tc <sup>a</sup> /Tc <sup>c</sup>	Arg18Pro	2	155G>C
Dr(a+)/Dr(a-)	Ser165Leu	5	596C>T
Es(a+)/Es(a-)	Ile46ASn	2	239T>A
IFC+/IFC-	Trp53 Stop Ser54 Stop	2 2	261G>A 263C>A
WES <sup>b</sup> /WES <sup>a</sup>	Leu48Arg	2	245T>G
UMC+/UMC-	Thr216Met	6	749C>T
GUTI+/GUTI-	Arg206His	6	719G>A



## 11. SYSTÉM Knops

### Ošetření erytrocytů enzymy a Cromer systém

Antigeny skupinového systému Cromer jsou odstraňovány pomocí ošetření erytrocytů enzymem  $\alpha$ -chymotrypsinem nebo pronázou. Natrávení erytrocytů enzymy papainem, trypsinem nebo ficinem nemá vliv na jejich reaktivitu.

### **10.3. Klinický význam protilátek systému Cromer**

Protilátky systému Cromer jsou především IgG typu, převážně podtřídy IgG1. Objevují se i podtřídy IgG2 a IgG4. Protilátky systému Cromer nejsou považovány za klinicky významné protilátky. V literatuře najdeme mnoho dokladů o úspěšném podání inkompatibilní transfuze pacientům s protilátkami anti-Cr<sup>a</sup> a anti-Tc<sup>a</sup>, ale i naopak též případy, kdy tyto protilátky způsobily potransfuzní reakci. Smith a spol. [18] popsali bezproblémové podání dvou jednotek CR(a+) inkompatibilní transfuze pacientovi s anti-Cr<sup>a</sup> protilátkou. Whitsell a Oxendine [18] taktéž popsali podání Cr(a+) inkompatibilní transfuze pacientovi s anti-Cr<sup>a</sup>, u kterého nebyla zaznamenána hemolýza. Kowalski a spol. [18] naproti tomu popsali hemolytickou potransfuzní reakci u ženy, které byly podány tři jednotky kompatibilních erytrocytů. Později byla v séru této ženy prokázána protilátka se silnou reaktivitou anti-Tc<sup>a</sup>.

Cromer systém je plně vyvinut na erytrocytech novorozenců. Do současné doby nebyl zaznamenán případ hemolytické onemocnění novorozence a plodu. [1,2,3,4,5, 18,19]

## **11. SYSTÉM Knops**

Systém Knops se skládá ze tří párů protikladných antigenů a jednotlivého antigenu Yk<sup>a</sup>. Protilátky proti těmto antigenům jsou definovány jako klinicky nevýznamné a obtížně identifikovatelné. Vyskytují se na receptoru 1 (CR1, CD35), jež patří mezi kontrolní proteiny komplementu. [1,20]

### **11.1. Historie**

V roce 1965 byla ve vzorcích sér nepříbuzných pacientů (Copeland, Stirling a Warinright) detekována protilátka s velmi podobnou specifitou. Tato protilátka byla pojmenována podle prvních dvou pacientů Co a St (Cost) a bylo pro ni stanoveno označení anti-Cs<sup>a</sup>. O deset let později byla objevena další protilátka proti antigenu York (anti-Yk<sup>a</sup>). Zjistilo se, že antigeny Cs<sup>a</sup> a Yk<sup>a</sup> jsou fenotypově příbuzné. I přes fenotypovou

## 11. SYSTÉM Knops

podobnost antigenů  $Cs^a$  a  $Yk^a$  je do systému Knops zařazen pouze antigen  $Yk^a$ . Další protilátka, která byla zařazena do systému Knops, byla objevena v šedesátých letech 20. století a byla pojmenována anti- $Kn^a$ . Zachycena byla v séru transfundované bělošské ženy. Antitetický antigen  $Kn^b$  byl zjištěn později v séru pacienta Hall, který byl senzibilizován protilátkou anti- $Kp^b$  ve velmi silném titru.

Mothan a Moulds [20] popsali antigen  $McC^a$ , příbuzný k antigenu  $Kn^a$ . Zajímavostí je, že většina protilátek anti- $McC^a$  je vytvářena u černošské populace a naproti tomu anti- $Kn^a$  se nachází především v bělošské populaci.

Další alelický pár  $Sl^a$  a  $Vil$  byl nezávisle popsán nezávislých publikacích. Jeden z autorů používá označení  $McC^c$  pro antigen  $Sl^a$  a  $McC^d$  pro antigen  $Vil$ . Pojmenování  $Sl^a$  bylo vytvořeno složením prvních písmen jmen pacientů Swain a Langley, u kterých byla tato protilátka prvně detekována. Po identifikaci proteinu, který má spojitost s antigeny Knops, byl antigen  $Sl^a$  přejmenován na S11 a antigen  $Vil$  na S12.

Poslední z antigenů s vysokou frekvencí výskytu patřící do systému Knops je antigen KAM. Ten byl později přejmenován ISBT komisí pro terminologii antigenů na membráně erytrocytů na KCAM. Protilátka proti antigenu KCAM byla detekována u bělošského muže, u kterého byl určen tzv. fenotyp Helgeson, což je serologické označení pro  $Kn$  null fenotyp.

Podobně jako antigen  $Sl^a$  i antigen KCAM se výrazně liší ve frekvenci výskytu při porovnání černošské a bělošské populace. Antigen KCAM je detekován jako antigen s vysokou frekvencí výskytu u bělošské populace, naproti tomu pouze 20 % afrických černochů je KCAM+. [20]

*Tabulka 14: Frekvence výskytu Knops antigenů v několika etnických skupinách*

Populace	$Kn^a$	$Kn^b$	$McC^a$	$McCb$	S11	S12	$Yk^a$	KCAM
Běloši	98 %	4 %	98 %	1 %	99 %	<1 %	90 %	98 %
Západní Afričané	100 %	NT	89-92 %	49-54 %	30-38 %	95 %	NT	20 %
Američtí Afričané	99 %	<1 %	90 %	44 %	51-61 %	80 %	98 %	NT
Brazilští Afričané	98 %	2 %	93 %	42 %	70 %	86 %	NT	53 %
Asijští Afričané	100 %	0 %	100 %	0 %	100 %	0 %	NT	95 %

*NT – netestováno*

## 11. SYSTÉM Knops

### 11.2. Receptor 1 (CR1) a systém Knops

#### CR1 (CD35)

CR1 je glykoprotein o molekulové hmotnosti 200 000, přítomný na erytrocytech, granulocytech, monocytech, B-lymfocytech, T-lymfocytech, glomerulárních podocytech a folikulodendritických buňkách v lymfatických uzlinách. V plazmě se nachází rozpustná forma CR1 polypeptidu. CR1 glykoprotein se nenachází na trombocytech.

V roce 1991 Rao a spol. a Moulds a spol. [20] nezávisle na sobě identifikovali receptor CR1 jako nosič antigenů systému Knops – Kn<sup>a</sup>, McC<sup>a</sup> a, S<sup>la</sup> a Yk<sup>a</sup>. O několik let později Petty a spol. [20] potvrdili, pomocí analýzy MAIEA přítomnost Knops systému na CR1 a zároveň tím potvrdili, že pouze jediný antigen Cs<sup>a</sup> se nevyskytuje na CR1. E-CR1 (erytrocytární CR1) se váže na imunitní komplexy, které jsou transportovány do jater či sleziny. V těchto orgánech dále dochází k pohlcování a odstraňování imunitních komplexů makrofágy. Bylo zaznamenáno, že jedinci s vysokým počtem CR1 receptorů mohou vykazovat slabě pozitivní reakce v přímém antiglobulinovém testu (PAT), které jsou pravděpodobně způsobeny zvýšeným množstvím navázaných imunokomplexů na CR1 receptory erytrocytů. [1,20]

#### CR1 gen

CR1 gen leží na chromozomu 1(1q32). Skládá se z 39 exonů pokrývajících asi 133 kb. Tyto exony kódují SCR přibližně 60 aminokyselin z funkčního CR1 proteinu. Sedm SCR je uspořádáno do dlouhých jednotek a pojmenováno LHR (dlouhé homologické repetice). Nejběžněji se vyskytuje alotyp CR1 (CR1-1), který je tvořen ze čtyř LHR (A,B,C,D), transmembránové části a cytoplazmatického konce. Vazebná místa pro C3b a C4b se nacházejí na SCR 8-9 a 15-16 (LHR B a C) a na SCR 1-2 (LHR-A).

Počet CR1 molekul přítomných na erytrocytech je u různých lidí odlišný, od 20 až přes 800. [1,20]

### 11.3. Helgeson, null fenotyp systému Knops?

Hlavní serologická charakteristika tzv. Helgeson neboli null fenotyp odpovídá nepřítomnosti antigenů Knops, McCoy a Sl<sup>a</sup> na erytrocytech. Fenotyp Helgeson byl pojmenován podle Margaret Helgeson, u které byl poprvé zaznamenán. Později byla u tohoto fenotypu určena i nepřítomnost antigenů Yk<sup>a</sup>. Ve skutečnosti však fenotyp Helgeson nereprezentuje pravý Knops null fenotyp, ale spíše vyjadřuje velmi nízkou hladinu Knops antigenů, které mohou být aglutinovány v antiglobulinovém testu pomocí silných Knops protilátek. Z tohoto důvodu je fenotyp Helgeson odlišný od null fenotypů, které

## 11. SYSTÉM Knops

běžně známe u ostatních skupinových systémů. Fenotyp Helgeson není spojován s protilátkami proti běžným antigenům systému Knops. Četnost výskytu fenotypu Helgeson je kolem 1 % u Afričanů a bílých Američanů. Erytrocyty fenotypu Helgeson mají velmi nízký počet CR1 molekul na erytrocytech, přibližně 10 % normálu. Jednotlivci, kteří nemají jeden z antigenů systému Knops, mají normální počet CR1 molekul a mohou být tudíž senzibilizováni odpovídající protilátkou. Exprese Knops antigenů, jakmile jsou detekovány pomocí aglutinového testu, silně koreluje s počtem molekul CR1 na erytrocytech. Erytrocyty, které obsahují 20 až 100 CR1 molekul, reagují v antiglobulinovém testu s protilátkami systému Knops negativně (Helgeson fenotyp), erytrocyty se 100-150 molekulami CR1 reagují slabě nebo negativně, záleží na použitém typu protilátky. Erytrocyty s více než 200 molekulami CR1 reagují pozitivně se všemi testovacími protilátkami. Fenotyp Helgeson a ostatní slabě reagující Knops antigeny jsou pravděpodobně následkem geneticky podmíněného sníženého množství molekul CR1. Naproti tomu nepřítomnost jednotlivých antigenů, které mohou vytvářet odpovídající protilátku je způsobena mutacemi v rámci CR1 genu. [1,20]

### 11.4. Antigeny systému Knops

#### 11.4.1. $\text{Kn}^a$ a $\text{Kn}^b$ (KN1 a KN2)

$\text{Kn}^a$ , byl poprvé popsán Helgesonem a spol. [1] v roce 1970. Četnost výskytu  $\text{Kn}^a$  antigenu je kolem 98-99 %.

Sérum, ve kterém byla primárně detekována protilátka anti- $\text{Kp}^a$ , reagovalo se všemi vzorky erytrocytů  $\text{Kn}(a-)$   $\text{McC}(a+)$ , ale nereagovalo se vzorky erytrocytů  $\text{Kn}(a-)$   $\text{McC}(a-)$ . Mallan a spol. nadnesli, že by se mohlo jednat o protilátku anti- $\text{Kn}^b$ . Prozatím nebyl popsán další případ záchytu protilátky anti- $\text{Kn}^b$ .

#### 11.4.2. $\text{McC}^a$ a $\text{McC}^b$ (KN3 a KN4)

Moulthan a Moulds [1] identifikovali antigen  $\text{McC}^a$  (McCoy), přestože  $\text{Kn}^a$  a  $\text{McC}^a$  mají frekvenci výskytu více jak 90 %. 53 %  $\text{McC}(a-)$  jedinců bylo též  $\text{Kn}(a-)$ . Frekvence výskytu  $\text{McC}(a-)$  je asi 1 - 2 % u bílých Američanů, a 3 – 10 % u afrických Američanů a západních Afričanů. Zajímavostí je, že zatímco protilátka anti- $\text{Kn}^b$  je antitetická k protilátce anti- $\text{Kn}^a$  v bělošské populaci, protilátka anti- $\text{McC}^b$  je antitetická k protilátce anti- $\text{McC}^a$  v populaci černošské. 45,3 % černošských dárců jsou  $\text{McC}(b+)$ . Prozatím antigen  $\text{McC}(b+)$  ještě v bělošské populaci nebyl detekován.  $\text{McC}^a$  a  $\text{McC}^b$  antigeny jsou děděny kodominantně.

$\text{McC}^a/\text{McC}^b$  polymorfismus je spojován se změnou A4759G na exonu 29 molekuly CR1, kódující Lys1590Glu v substituci v SCR na LHR-D CR1 molekuly.

## 11. SYSTÉM Knops

### 11.4.3. S<sup>la</sup> a Vil (KN4 a KN7)

SI<sup>a</sup> (Swain-Lagnley) je antigen s vysokou frekvencí výskytu u bělochů, naproti tomu u černochů se tento antigen vyskytuje s výrazně nižší frekvencí. Černoši McC(a-) jsou SI(a-), ať již jsou Kn(a-) či Kn(a+). 45 % Kn(a+) McC(a+) Afrických Američanů jsou též SI(a-). Všichni běloši Kn(a-) McC(a-) jsou též SI(a-), pouze 1 % Kn(a+) McC(a+) bělochů bylo SI(a-).

U černochů je protilátka anti-Vil protikladná k protilátce anti-SI<sup>a</sup>. U bělochů dosud nebyly prokázány Vil+ erytrocyty.

SI<sup>a</sup>/Vil polymorfismus je spojován se změnou A4828G na exonu 29 CR1 kódující substituci Arg1601Gly na CCP 25 CR1.

### 11.4.4. Yk<sup>a</sup>

Protilátka anti-Yk<sup>a</sup> (York) byla původně zaměněna za protilátku anti-Cs<sup>a</sup>, jelikož reagovala s dvěma vzorky Cs(a-). Nicméně na erytrocytech paní York byl detekován antigen Cs(a+). Moulthan a Giles [1] popsali Yk<sup>a</sup> jako nový antigen, který je příbuzný k antigenu Cs<sup>a</sup>. Yk<sup>a</sup> je děděn jako dominantní znak. Yk<sup>a</sup> gen je přítomen přibližně u 68 % bělošské populace a 87 % Afrických Američanů.

### 11.4.5. Cs<sup>a</sup> a Cs<sup>b</sup>

Giles a spol. [1] popsali protilátku, která byla reaktivní s 98 % erytrocytů obyvatel severní Evropy. Pojmenovali ji anti-Cs<sup>a</sup> podle počátečních písem pacientek. Protilátka anti-Cs<sup>a</sup> prokazuje mnoho podobných rysů jako protilátky proti systému Knops. Je velice komplikovaně stanovitelná, především z důvodu proměnlivé exprese Cs<sup>a</sup> antigenu. Cs<sup>a</sup> protilátka patří mezi klinicky nevýznamné.

Přestože je antigen Cs fenotypově spojován se systémem Knops, především s antigenem Yk<sup>a</sup>, nejsou antigeny Cs<sup>a</sup> a Cs<sup>b</sup> zahrnuty do tohoto systému z následujících důvodů:

1. Cs<sup>a</sup> není přítomen na CR1 receptoru.
2. Cs<sup>a</sup> byl detekován u tří ze čtyř vzorků s fenotypem Helgeson.
3. Cs<sup>a</sup> je rezistentní vůči působení trypsinu, chymotrypsinu a AET.

Podstata spojitosti Cs<sup>a</sup> antigenu s Knops systémem je stále nejasná. [1,20]

## 11.5. Charakteristika antigenů systému Knops

Knops antigeny se značně liší v síle reakcí. Slabě reagující erytrocyty, erytrocyty dlouhodobě skladované či erytrocyty s nižším množstvím E-CR1 mohou být falešně určeny jako Knops negativní.

## Působení enzymů a redukčních agens

Antigeny systému Knops jsou všeobecně rezistentní vůči působení enzymů ficinu a papainu. Protilátky proti systému Knops nereagují s erytrocyty ošetřenými trypsinem. Trypsin štěpí molekulu CR1 v místě SCR28. Skupinové antigeny systému Knops se nacházejí na SCR25 a jsou proto odštěpeny z membrány erytrocytů. Tato schopnost napomáhá při identifikaci protilátek. [1,4,20]

### **11.6. Protilátky proti systému Knops**

Protilátky proti systému Knops jsou všeobecně obtížně identifikovatelné. Částečně pro jejich odlišnou antigenní sílu exprese též nelze provést adsorpci nebo eluci protilátek. Knops protilátky jsou obvykle typu IgG. Reagují v AGH testu a neaktivují komplement. Knops protilátky patří mezi klinicky nevýznamné. Nezpůsobují HON. Exprese CR1 molekul se snižuje během těhotenství. V třetím trimestru dosahují svého minima a po porodu se vrací zpět k normálnímu množství a to již během 48 hodin.

### **11.7. Onemocnění spojené s CR1**

V roce 1997 Rowe a spol. [20] zjistili, že CR1 funguje jako ligand pro rozetování *Plasmodium falciparum*. Erytrocyty jedinců, kteří mají snížené množství molekul CR1 (fenotyp Helgenson) nejsou infikovány *Plasmodium falciparum*, protože nevytváří roze-ty.

Jedinci s antigenem SI(a-) jsou méně infikováni parazity, dochází u nich k rozetování ligandu PfEMP1. Předpokládalo se, že tento polymorfismus se může objevovat ve vybraných endemických regionech, které jsou postiženy malárií a může působit jako ochrana proti několika typům malárií. Tato hypotéza byla testována u Afričanů z Mali a Keni, u kterých byl prokázán kombinovaný Knops haplotyp Kn(a+)/McC(a-)/SI(a-). CR1, tak jako další receptory komplementu, byl identifikován jako receptor usnadňující vstup různých patogenních organismů do buněk. Paraziti používající CR1 pro průnik do buněk jsou *Leishmania major*, *Legionella pneumophila*, *Leishmania Panamensis* a *Mycobacterium tuberculosis*. [1, 2,3,4,5,20]

## 12. SYSTÉM Indian a AnWj antigen

Systém Indian se skládá ze dvou protikladných antigenů:  $\text{In}^a$ , který se nachází přibližně u 10 % arabské populace a u 3 % bombajských Indů, a antigenu  $\text{In}^b$  s vysokou frekvencí výskytu ve všech populacích. V roce 2007 byly do systému Indian přijaty dva nové vysokofrekvenční antigeny IN3 (INFI) a IN4 (INJA). Antigeny tohoto systému se nacházejí na CD44 glykoproteinu kódovaném genem CD44, který je umístěn na chromozomu 11p13.

Antigen s vysokou frekvencí výskytu AnWj nebyl sice přidán do systému Indian, ale je lokalizován na izoformě CD44 nebo je s ní velmi úzce propojen. [1,9,21]

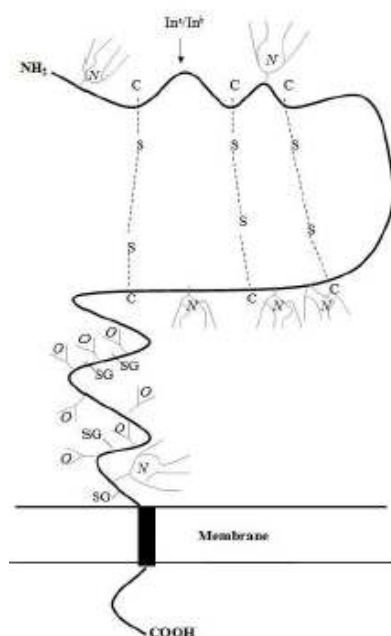
### 12.1. CD44 a Indian antigeny

#### CD44

CD44 je různorodá skupina monoklonálních protilátek proti epitopům glykoproteinů, které jsou přítomné na buňkách různých tkání, včetně erytrocytů. CD44 glykoprotein též nazývaný jako  $\text{In}(\text{Lu})$ -příbuzný p80, p85, Hermes antigen a H-CAM („lymfocyte homing associated cell adhesion molekule“).

Gen CD44 pokrývá 50kb DNA a skládá se z 20 exonů. CD44 existuje v mnoha izoformách. CD44H (hemopoetické) standardní formě této molekuly, která se nachází na erytrocytech a leukocytech. Skládá se z 248 aminokyselin N-terminální extracelulární domény, z 21 aminokyselin membránové domény a 72 aminokyselin C-terminálního cytoplazmatického konce. Z důvodu značné glykosylace a přítomnosti glykosaminoglykanu chondroitinu je CD44 zařazen mezi proteoglykany. Cytoplazmatická doména může interagovat s membránou cytosketu navázáním na protein 4.1 nebo ankyrin. [1,21]

CD44 glykoprotein lze detekovat na mnoha tkáních a plní různorodé funkce. Jeho hlavní funkcí je schopnost navázání na hyaluronan, který je součástí extracelulární matrix.



Obrázek 10: Model glykoproteinu CD44H. Extracelulární doména se skládá ze dvou částí: membránově-proximální části obsahující N-glykosylované strany (N), několika O-glykosylovaných stran (O), a několik Ser-Gly chondroitin sulfátové části (SG) a distální části

## 12. SYSTÉM Indian a AnWj antigen

*obsahující pět N-glykosylovaných částí a šest cysteinových zbytků(C). Přítomnost tří disulfidických vazeb (S-S). Je naznačeno i místo aminokyselinové substituce zodpovědné za  $In^a/In^b$  polymorfismus. [21]*

### 12.2. Antigeny Indian

#### 12.2.1. $In^a$ a $In^b$ (IN1 a IN2)

V roce 1973 Badakere a spol. [1] popsali nový antigen, nalezený na erytrocytech přibližně 3 % populace Indů z Bombaje, a pojmenovali jej  $In^a$ . O dva roky později Giles [1] našel jeho antitetický antigen  $In^b$ .  $In^b/In^a$  polymorfismus je vytvořen na základě jednonukleotidové substituce 252C>G na exonu 2 genu CD44 kódující aminokyselinovou změnu Arg46Pro.

#### $In^a$ a $In_b$

$In^a$ , antigen s nízkou frekvencí výskytu se prokazuje u evropské populace jen velice vzácně. Nachází se především u Indů (4 %), Iráčanů (11 %) a Arabů (12 %). Velice vzácný fenotyp  $In(a-b-)$  byl detekován pouze u jednoho jedince, který trpěl neobvyklou formou kongenitální dyserytropoetické anémie. Tato forma anémie vytvářela CD44 deficitní erytrocyty, které byly  $In(a-b-)$ , ale též  $Co(a-b-)$  a vykazovaly slabou expresi LW antigenů.

$In^b$  antigen, antigen s vysokou frekvencí výskytu.

$In^a$  a  $In^b$  jsou antigeny citlivé k působení ficinu, papainu, trypsinu a chymotrypsinu. AET a DTT narušují disulfidické vazby.

$In^a$  antigen se nachází na erytrocytech novorozenců přibližně v 25 % v porovnání s erytrocyty dospělého člověka.  $In^b$  antigen je na erytrocytech novorozence již plně vyvinut.

#### 12.2.2. IN3 (INFI) a IN4 (INJA)

Jedná se o antigeny s vysokou frekvencí výskytu. Nepřítomnost těchto antigenů je výsledkem homozygotní mutace kódující H85Q a T163R na genu CD44.

### 12.3. Protilátky proti systému Indian

Antigeny systému Indian jsou velmi dobrými imunogeny. Anti- $In^a$  a anti- $In^b$  mohou být detekovány přímou aglutinací antigen-pozitivních erytrocytů, přičemž silněji reagují v nepřímém antiglobulinovém testu. Obě protilátky mohou způsobit lehkou potransfuzní hemolytickou reakci. Ani jedna z nich nezpůsobila HON. Většinou jsou typu IgG ale mohou být i typu IgM. Neaktivují komplement. [1,9,21]



## 13. SYSTÉM Ok

### 12.4. Antigen AnWj

Anti-Anton protilátka namířená proti antigenu s vysokou frekvencí výskytu byla prvně popsána Boorman a Tipettem [1] v roce 1972.

Tento relativně jednoduchý skupinový systém je zvláštní svou spojitostí s In(Lu) genem. Antigen AnWj se nachází na CD44 a mohl by být eventuálně přiřazen do systému Indian. Síla exprese antigenu AnWj je velice odlišná u různých jedinců. Na rozdíl od antigenů In<sup>a</sup> a In<sup>b</sup>, nemá na antigen AnWj vliv působení enzymů. Předpokládá se, že se tento antigen nachází v místě CD44, které není enzymy štěpeno. Protilátky proti antigenu AnWj jsou většinou typu IgG a nejlépe jsou zachyceny v nepřímém antiglobulinovém testu. Anti-AnWj může způsobit potransfuzní hemolytickou reakci, ale nezpůsobuje HON. Tento antigen není vytvořen na erytrocytech pupečnickové krve. Vytváří se teprve v rozmezí od 3 do 46 dnů po narození. Protilátky anti-AnWj se často projevují jako autoprotiilátky. [1,2,3,4,5,21]

## 13. SYSTÉM Ok

Tento systém je tvořen třemi antigeny: Ok<sup>a</sup> (OK1) a přechodně pojmenovanými antigeny OK2 a OK3. Jedná se o antigeny s vysokou frekvencí výskytu. Systém je lokalizován na molekule CD147 a je kódován genem BSG, který se nachází na chromozomu 19p13. [1,22]

### 13.1. Antigeny systému Ok

Tabulka 15: antigeny systému Ok [22]

Číslo antigenu	OK1	OK2	OK3
Název antigenu	Ok <sup>a</sup>	OKGV	OKVM

### 13.2. Molekulární genetika

Kódující gen basigin (BSG) se skládá z osmi exonů a kóduje transmembránový glykoprotein tvořený 269 aminokyselinami. Sekvenováním cDNA tří Ok(a-) jedinců byla prokázána mutace 274 G>A na exonu 3, který kóduje změnu Glu92Lys na aminokonci glykoproteinu. Uvedená mutace vede k tvorbě Ok(a-) fenotypu.

OK2 fenotyp vzniká nukleotidovou substitucí na exonu 2 genu BSG: 176G>T, která odpovídá za změnu aminokyselin Gly59Val.

## 14. SYSTÉM RAPH

OK3 fenotyp vzniká mutací na exonu 2, 178G>A, která způsobuje změnu aminokyseliny Val60Met polypeptidu basigin. [1,22]

### 13.3. Biochemie

Systém OK se nachází na basiginu (CD147). Basigin je imunoglobulin o molekulové hmotnosti 35 až 68 kDa (předpokládám, že to má být kDa). Je rozšířen v lidských tkáních, na leukocytech a erytrocytech. CD 147 hraje důležitou roli v adhezi buněk a invazi tumoru. Basigin navozuje produkci matricí metaloproteináz ve fibroblastech a rovněž v karcinogenních buňkách. Basigin způsobuje expresi vaskulárního endoteliálního růstového faktoru a hyaluronanu, což stimuluje angiogenezi v nádorové tkáni. V současné době výzkum prokázal jeho funkci v podobě signálního receptoru pro extracelulární cyklofilinové rodiny proteinů. Protein cyklofilin (CyPA) je včleněn do virionu HIV-1 a významně zvyšuje první kroky buněčné infekce HIV-1. CD147 je kofaktorem, který zprostředkovává aktivitu viru spojeného s CyPA. [1,4,22]

### 13.4. Protilátky proti systému Ok

Protilátka anti-Ok byla poprvé detekována v séru japonské ženy (S.Ko.G.). Protilátka je typu IgG a je snadno zachytitelná metodou nepřímého antiglobulinového testu.

Antigeny Ok jsou antigeny s vysokou frekvencí výskytu, tudíž se protilátky anti-Ok vyskytují velice vzácně.

Protilátka anti-Ok<sup>a</sup> patří mezi klinicky významné protilátky. Anti-Ok<sup>a</sup> může způsobit potransfuzní hemolytickou reakci i hemolytické onemocnění novorozence a plodu.[1,2,3,4,5,22]

## 14. SYSTÉM RAPH

V roce 1987 Daniels a spol. [1] popsali antigen MER2 (RAPH). Tento nový erytrocytární polymorfismus byl jako první určen pomocí monoklonálních protilátek.

MER2 je kódován genem, který se nachází na konci krátkého raménka chromozomu 11, 11p15.

### 14.1. MER2 polymorfismus erytrocytů a antigen MER2 (RAPH1)

Monoklonální protilátky MER2 jsou reaktivní s erytrocyty v nepřímém antiglobulinovém testu za použití myších IgG protilátek. Síla reakce se liší u různých vzorků erytro-

## 15. SYSTÉM JMH

cytů. Dle Mendlových zákonů dědičnosti je antigen MER2 děděn jako dominantní znak. MER2+ erytrocyty jsou přítomny u 92 % obyvatel, MER2- pouze u 8 % této populace.

MER2 je rezistentní vůči působení papainu a sialidázy. MER2 je z erytrocytů odštěpen při použití trypsinu, chymotrypsinu, pronázy. Disulfidické vazby jsou přerušeny použitím AET. [1]

### 14.2. Protilátky proti MER2

Protilátka anti-MER2 je typu IgG a je zachycena pomocí antiglobulinového testu. [1]

## 15. SYSTÉM JMH

JMH (JMH1) je antigen s vysokou frekvencí výskytu a je jediným antigenem systému John Milton Hagen (JMH). JMH- je většinou získaný fenotyp, i když byl zaznamenán jako dominantně zděděný znak. JMH antigen je semaphorin CDw108. SEMA7A, gen kódující CDw108, se nachází na chromozomu 115q23-24.

### 15.1. JMH (JMH1)

Tento antigen poprvé popsal Sabo a spol. [1] v roce 1978. V mnoha případech je JMH- pravděpodobně získaným fenotypem. Takovýto fenotyp je charakterizován snížením exprese nebo její ztrátou. Z tohoto pohledu může být JMH brán jako přechodný fenomén.

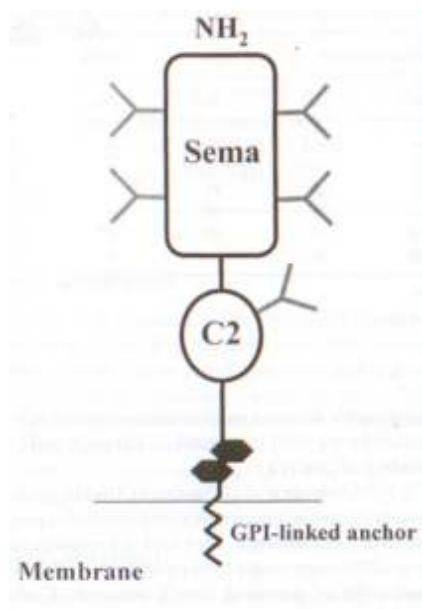
Byl zaznamenán případ rodiny, kdy se JMH- znak projevoval po dobu tří generací. Tento vzácný fenotyp je děděn jako autozomálně dominantní znak. JMH antigen je obvykle vyjádřen na erytrocytech novorozenců velice slabě. Plně se vytváří během několika prvních roků života dítěte. JMH lze odstranit z erytrocytů pomocí enzymů papainu, trypsinu a chymotrypsinu. Disulfidické vazby jsou narušovány AET.

### 15.2. Anti-JMH

V séru mnoha JMH- pacientů byla zjištěna anti-JMH protilátka. Těmto pacientům nebyla podána transfuze ani pacientky nebyly těhotné. JMH protilátky jsou obvykle typu IgG (převážně IgG4, ale byly zaznamenány i případy IgG1, IgG2 a IgG3). Anti-JMH protilátka nezpůsobuje potransfuzní hemolytické reakce ani HON.

### 15.3. JMH se nachází na semaforinu CDw108

V roce 1999 Yamada a spol. [1] izolovali glykoprotein CDw108. CDw108 je stejný jako Sema7A (H-Sema-L), který patří do skupiny glykoproteinů semaphorin. CDw108/Sema7A je polypeptid o 666 aminokyselinách, který v sobě zahrnuje 46 aminokyselin signálního peptidu a 19 aminokyselin GPI kotvy. [1,2,3,4,5]



Obrázek 11: CDw108 (Sema7A), N-terminální sema doména, C2-sada-IgG-like doména a GPI kotva, Y, N-glykan. [1]

### 16. Antigen s nízkou frekvencí výskytu

Jedná se antigeny, které nalézáme na erytrocytech ve většině populací velice vzácně, a tyto antigeny nejsou zařazeny do žádných z již existujících skupinových systémů. LWA antigeny patří do číselné série 700. Antigeny, které náležejí do této skupiny, musí splňovat následující kritéria:

- a) frekvence výskytu musí být nižší než 1 %,
- b) antigen musí být děděn,
- c) antigen musí být identický, nesmí patřit do žádných již ustanovených skupinových systémů či být s nimi příbuzný,
- d) musí být prokázáno, že antigeny jsou sérologicky odlišné od ostatních LFA antigenů,
- e) musí být k dispozici protilátka a erytrocyty s antigenem, aby mohly být identifikovány další případy.

## 16. Antigen s nízkou frekvencí výskytu

### 16.1. Antigeny LFA

Seznam nízkofrekventních antigenů je v tabulce 16.

Tabulka č. 16: Antigeny s nízkou frekvencí výskytu [1]

Číslo	Název	Symbol
700002	Batty	By
700003	Christiansen	Chr <sup>a</sup>
700005	Biles	Bi
700006	Box	Bx <sup>a</sup>
700015	Radin	Rd
700017	Torkildsen	To <sup>a</sup>
700018	Peters	Pt <sup>a</sup>
700019	Reid	Re <sup>a</sup>
700021	Jensen	Je <sup>a</sup>
700023	Hey	Hey
700028	Livesay	Li <sup>a</sup>
700039	Milne	
700040	Rasmussen	RASM
700043	Oldeide	OI <sup>a</sup>
700044		JFV
700045	Katagiri	Kg
700047	Jones	JONES
700049		HJK
700050		HOFM
700052		SARA
700053		LOCR
700054		REIT
		SHIN

## 16.2. Protilátky

Protilátky proti antigenům s nízkou frekvencí výskytu jsou stimulovány po podání transfuze nebo v těhotenství.

Tyto protilátky se obvykle projeví v následujících případech:

- a) protilátka způsobí HON,
- b) při testu kompatibility jedna krvinka reaguje s patientským sérem pozitivně,
- c) sérum skupinové reagentie je kontaminováno protilátkou proti LFA, během fenotypování je detekována nespecifická reakce,
- d) specifita je určena dodatečně, když je sérum se známou protilátkou proti LFA testováno s erytrocyty vzácného fenotypu.

V případě, kdy erytrocyty reagují se sérem obsahující známou protilátku proti LFA, není možné reakci uzavřít, protože sérum obsahuje specifickou protilátku proti LFA. Nejprve musí být proveden adsorpční a eluční test, aby bylo možné určit specifitu.

### Klinická významnost protilátek proti LFA

Protilátky proti antigenům s nízkou frekvencí výskytu série 700 nejsou převážně klinicky významné.

Nicméně protilátky anti-HJK, anti-Kg a anti-REIT způsobily HON, které vyžadovalo výměnnou intrauterinní transfuzi. Protilátky anti-HOFM a anti-LOCR způsobily středně těžké HON.

Anti-By, anti-Re<sup>a</sup> a anti-RASM způsobily pozitivní PAT u pupečnickové krve, ale bez jakýchkoliv známek HON.

LFA protilátky nepůsobí potransfuzní reakce. Přesto zde přetrvává riziko, že potenciálně nebezpečné protilátky proti antigenům s nízkou frekvencí výskytu nebudou detekovány testem kompatibility a mohou následně způsobit nežádoucí reakce. [1,2,3,4,5]

## 17. Antigeny s vysokou frekvencí výskytu

Antigeny, které jsou zařazeny mezi antigeny s vysokou frekvencí výskytu (HFA, „High frequency antigens“) do tzv. série 901, musí splňovat následující kritéria:

- a) frekvence výskytu musí být vyšší než 90 %, přičemž většina antigenů zahrnutá do této skupiny, má frekvenci výskytu vyšší než 99 %,
- b) antigen musí být děděn,
- c) antigen musí být identický, nesmí patřit do žádných již ustanovených skupinových systémů nebo nesmí být velmi podobný jinému antigenu s vysokou frekvencí výskytu,
- d) musí být prokázáno, že je serologicky odlišný od ostatních antigenů HFA.

V sérii 901 je zaznamenáno 11 HFA antigenů (tabulka 17). Do této skupiny patří také antigeny Sd<sup>a</sup> s frekvencí výskytu 91 %, antigen AnWj (901009) a Duclos (901013), které jsou díky své biochemické podobnosti popsány v kapitole o systému Indian.

Protilátky proti antigenům HFA jsou z pohledu krevní transfuze velice nebezpečné. Protilátky anti-Vel a anti-Lan již opakovaně způsobily hemolytickou potransfuzní reakci.

*Tabulka 17: Antigeny s vysokou frekvencí výskytu[1]*

Číslo	Název	Symbol
901001		Vel
901002	Langereis	Lan
901003	August	At <sup>a</sup>
901005		Jr <sup>a</sup>
901008		Emm
901009	Anton	AnWj
901012	Sid	Sd <sup>a</sup>
901013	Duclos	
901014		PEL
901015		ABTI
901016		MAM

### 17.1. Vel

V roce 1952 Sussman a Miller [1] popsali protilátku anti-Vel. Antigen Vel se stal prvním antigenem, který nebyl přiřazen do žádných existujících skupinových systémů.

Expresí antigenu Vel je velice různorodá. U některých jedinců je antigen na erythrocytech vyjádřen velice slabě. Proto je doporučeno, aby byl pro potvrzení negativního

## 17. Antigeny s vysokou frekvencí výskytu

výsledku při typování erytrocytů na přítomnost Vel antigenu použít dvojstupňový anti-globulinový test s přidáním komplementu. .

Vel antigen je vyjádřen na erytrocytech pupečnickové krve ještě slaběji než na erytrocytech dospělého člověka.

Antigen Vel je rezistentní vůči proteázám. Naopak erytrocyty ošetřené papainem nebo ficinem zlepšují detekci slabých Vel antigenů.

Vel antigen nebyl detekován na lymfocytech, granulocytech nebo monocytech.

### Anti-Vel

Aloprotilátka anti-Vel nebyla zachycena jako přirozená protilátka. Vzniká senzibilizací po podání transfuze krve. Vel protilátky jsou především IgM typu a aktivují komplement. Mohou být též typu IgG (podtřídy IgG1 i IgG3).

Anti-Vel patří mezi klinicky velice významné protilátky, protože mohou způsobit akutní hemolytickou potransfuzní reakci. Naproti tomu, přestože byla tato protilátka detekována několikrát u těhotných žen, nebyl zaznamenán vznik HON. Pravděpodobným důvodem je, že se jedná protilátku převážně typu IgM a Vel antigen je vyjádřen na neonatálních erytrocytech velice slabě.

Protilátka anti-Vel se objevila i v podobě autoprotilátky, která může být zodpovědná za vznik onemocnění AIHA.

## **17.2. Lan**

Lan antigen byl pojmenován po panu Lan, jehož bratr byl Lan-. Lan- fenotyp vzniká v důsledku homozygotní konstituce vzácného recesivního genu. At(a-) fenotyp byl nalezen především v černošské populaci.

### Anti-Lan

Vznik protilátky anti-Lan může být stimulován těhotenstvím. Nebyla zaznamenána přítomnost anti-Lan protilátky přirozeného původu. Lan aloprotilátky jsou převážně podtřídy IgG1 a IgG3, méně již podtypu IgG2 a IgG4. Některé z anti-Lan protilátek aktivují komplement.

Anti-Lan protilátky jsou zodpovědné za středně těžkou hemolytickou potransfuzní reakci. Prozatím nebylo zaznamenáno, že by způsobovaly též HON. V několika případech byl při vyšetření pupečnickové krve určen pozitivní PAT. Po eluci byla zjištěna pro-



## 17. Antigeny s vysokou frekvencí výskytu

tilátka anti-Lan. Doposud byl publikován pouze jeden případ záchytu autoprotilátky anti-Lan, která způsobila střední hemolytickou anémii.

### 17.3. At<sup>a</sup> (August)

Protilátka proti antigenu At<sup>a</sup> byla prvně popsána Applewhaite a spol. [1] v roce 1967. At(a) fenotyp je výsledkem homozygotní konstituce recesivního genu.

Protilátka anti-At<sup>a</sup> je stimulována podáním transfuze či v průběhu těhotenství. Nebyl zaznamenán případ protilátky anti-At<sup>a</sup> přirozeného původu. At<sup>a</sup> protilátky jsou především typu IgG, podtřídy IgG1, IgG3 a IgG4. Pouze v jednom případě se jednalo o protilátku typu IgM.

Protilátka anti-At<sup>a</sup> může způsobit středně těžkou potransfuzní reakci nebo pozdní hemolytickou potransfuzní reakci a může vyvolat i HON.

### 17.4. Jr<sup>a</sup>

Protilátka anti-Jr<sup>a</sup> byla popsána v roce 1970 (Stroup a MacIlroy) [1].

Jr(a-) fenotyp byl nalezen u lidí původem ze severní Evropy, u romské populace, beduínských Arabů a Mexičanů.

Anti-Jr<sup>a</sup> je stimulována podáním transfuze či v průběhu těhotenství. Protilátka anti-Jr<sup>a</sup> je převážně typu IgG, podtřídy IgG1, někdy také IgG3. Tato protilátka aktivuje komplement a způsobuje novorozeneckou žloutenku. Je zodpovědná za pozitivní PAT pupečnickové krve.

### 17.5. Emm

Anti-Emm protilátka byla popsána Danielsem a spol. [1] Některé z detekovaných protilátek anti-Emm byly přirozeného původu, jednalo o typ IgG i IgM.

Emm antigen je pravděpodobně propojen s proteinem GPI. Erytrocyty pacientů postižené PNHIII byly vždy Emm-, pacienti s PNHI byli naproti tomu Emm+.

### 17.6. AnWj

AnWj je vysokofrekventní antigen, který je velice slabě exprimován na erytrocytech jedinců s genem *In(Lu)*. AnWj antigen je úzce spojován s CD44 glykoproteinem, který je nosičem systému Indian (viz systém Indian).

## 18. POUŽÍVANÉ METODY V IMUNOHEMATOLOGII

### 17.7. Duclos

Duclos antigen je závislý na přítomnosti Rh antigenů a U antigenu MNS systému. Protilátka anti-Duclos reaguje se všemi erytrocyty vyjma erytrocytů Rh<sub>null</sub> fenotypu a erytrocytů U-negativních.

### 17.8. PEL

Protilátka anti-PEL je stimulována podáním transfuze či v průběhu těhotenství. Nicméně nezpůsobuje HON.

### 17.9. ABTI

Případy anti-ABTI protilátky byly detekovány u žen s mnohočetným těhotenstvím. Tato protilátka však nezpůsobila HON. Protilátka anti-ABTI je především typu IgG.

### 17.10. MAM

Protilátku anti-MAM popsali Montgomery a spol. Tato protilátka patří mezi protilátky klinicky významné, které mohou způsobit HON vyžadující intrauterinní transfuzi. Jsou podtřídy IgG1 a IgG3.

### 17.11. GIL

GIL protilátka byla doposud nalezena pouze u těhotných bělošských žen. Způsobuje pozitivní PAT, ale prozatím nebylo zjištěno, že by byla zodpovědná i za HON. Protilátka anti-GIL může způsobit hemolytickou potransfuzní reakci. [1,2,3,4,5]

## 18. POUŽÍVANÉ METODY V IMUNOHEMATOLOGII

### 18.1. Základní metody používané v imunoematologii.

#### Antiglobulinové testy AGH (Coombsovy testy)

Antiglobulinové testy se běžně používají pro detekci a identifikaci antierytrocytárních protilátek. Protilátky navázané na erytrocytech pacienta lze detekovat za pomoci protilátek proti lidskému globulinu (AGH). Fab část imunoglobulinů obsažených v AGH se naváže na Fc část protilátek navázaných na erytrocytech. Toto přemostění, protilátka navázaná na erytrocyty s AGH, vede k aglutinaci, která je makroskopicky či mikroskopicky viditelná.

AGH rozlišujeme na monoklonální a polyklonální, monospecifické a polyspecifické. Monoklonální protilátky jsou vyráběny z jedné buněčné linie. Polyklonální protilátky se

## 18. POUŽÍVANÉ METODY V IMUNOHEMATOLOGII

připravují imunizací různých živočichů. Zvířata (např. králíci) jsou imunizována proti lidským IgG.

Polyspecifické AGH je směs protilátek proti IgG i proti složkám komplementu.

Monospecifické AGH obsahuje protilátku namířenou proti jednotlivým složkám lidského globulinu, např. anti-IgM, -IgG, -C3b, -C4. Monospecifická séra jsou nejčastěji zaměřena proti IgG a proti složce komplementu C3d. Anti-IgG složka AGH séra rozpozná klinicky významné protilátky, anti-C3d je nejvíce spojována s imunní hemolýzou. V praxi se nejčastěji používá monospecifické AGH s anti-IgG.

Pro AGH je vybrána protilátka proti složce anti-C3d. V případě, že nedojde ke kompletní aktivaci komplementu se vznikem MAC, C3b složka nemá katalytickou funkci a je štěpena na C3c a C3d. C3d složka zůstává připojena na erytrocytech a AGH ji zachytí. [7]

Rozlišujeme dva typy Coombsova testu, tzv. přímý a nepřímý antiglobulinový test.

Přímý antiglobulinový test se používá k průkazu protilátek a/nebo komplementu, vázaného na erytrocyty in vivo.

Nepřímý antiglobulinový test slouží k detekci protilátek namířených proti erytrocytům, které jsou přítomny volně v séru pacienta. Protilátky se během inkubace navážou na erytrocyty se známou antigenní strukturou.

### 18.2. Postup vyšetření AGH testů

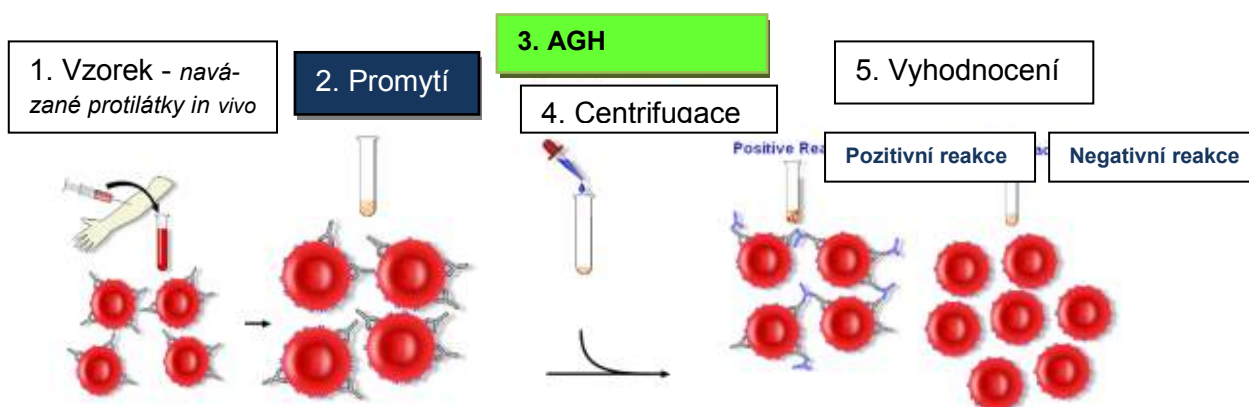
#### Zkumavkový test

#### Přímý antiglobulinový (Coombsův) test

Vyšetřované erytrocyty promyjeme pomocí izotonického roztoku chloridu sodného. Připravíme z nich 3 – 4 % suspenzi, ke které přidáme 1 – 2 kapky monospecifického nebo polyspecifického AGH. Ihned centrifugujeme a odečteme mikroskopicky. [7]

## 18. POUŽÍVANÉ METODY V IMUNOHEMATOLOGII

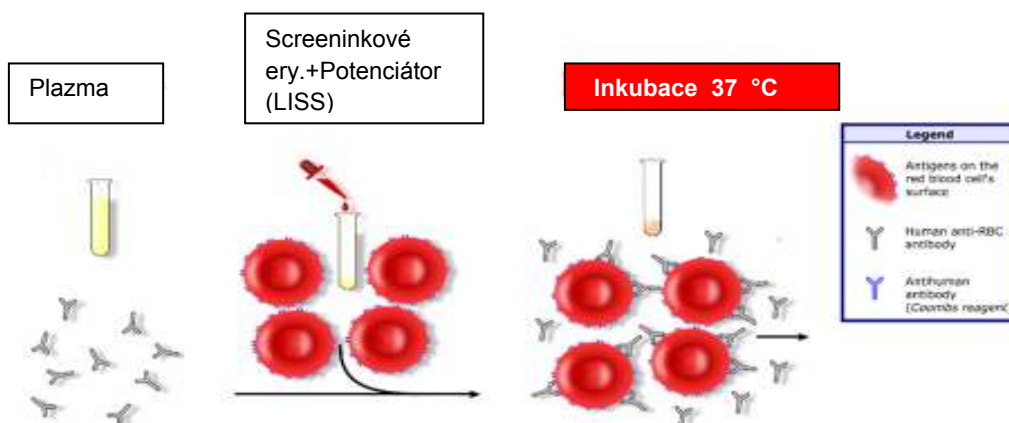
Obrázek č. 12: Postup PAT, [www.wikipedia.org/wiki/Coombs\\_test](http://www.wikipedia.org/wiki/Coombs_test)



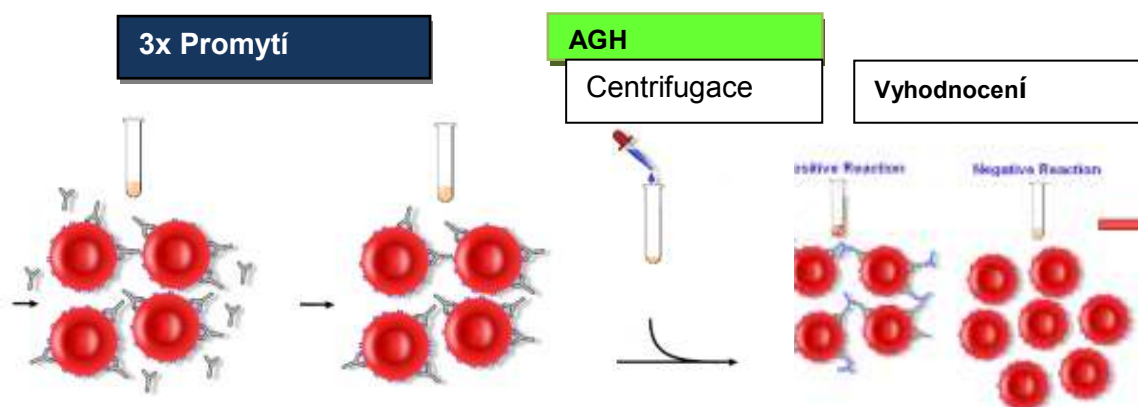
### Všeobecný popis zkumavkového nepřímého antiglobulinového testu.

Do příslušné zkumavky aplikujeme 2 kapky testovacího séra nebo plazmy (či eluátu). K vyšetřenému vzorku přidáme 1 kapku 3 - 4 % suspenze diagnostických erytrocytů o známé antigenní struktuře. Pro zvýšení senzitivity se k testovacímu vzorku může aplikovat potenciátor (PEG, LISS). Vše inkubujeme při  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  po dobu 10 -15 minut. Inkubační dobu je možné prodloužit až do 30 minut. Po inkubaci promyjeme erytrocyty a tím odstraníme nenasazené protilátky či ostatní látky, které by mohly způsobit nespecifické reakce. Po promytí přidáme k terčíku erytrocytů 1 – 2 kapky vybraného AGH. Promícháme a centrifugujeme. Po centrifugaci zkumavku s erytrocyty jemně protřepáváme a mikroskopicky sledujeme aglutinaci.

Obrázek č. 13: Postup NAT, [www.wikipedia.org/wiki/Coombs\\_test](http://www.wikipedia.org/wiki/Coombs_test)



## 18. POUŽÍVANÉ METODY V IMUNOHEMATOLOGII



### Gelový systém

Princip testu je založen na gelové technice popsané pro detekci aglutinačních reakcí červených krvinek Y. Lapierrrem. K aglutinaci dochází, když se na antigeny červených krvinek naváží odpovídající protilátky přítomné v reagenzii nebo ve vzorku séra či plazmy. Karta gelového systému je tvořena plastovým nosičem, který obsahuje 6 - 8 mikrozkušavek. Každý sloupec obsahuje polymerizované mikročástice dextranu v pufovaném médiu, které slouží jako filtr. Částice dextranu jsou smíšeny s reagenzií, která obsahuje lidský antiglobulin. Během centrifugace jsou aglutináty erytrocytů v závislosti na jejich velikosti zachyceny na povrchu nebo uvnitř gelového sloupce. Neaglutinované červené krvinky procházejí ke dnu mikrozkušavky. Podle konečného rozmístění krvinek v gelovém sloupci je možné vyhodnotit výsledky příslušného testu (viz obrázek 14). [25]

### PAT – gelový systém

50  $\mu$ l suspenze erytrocytů napipetujeme do mikrozkušavky gelového systému a ihned centrifugujeme. Po ukončení centrifugace výsledek odečteme makroskopicky.

### NAT v gelovém systému

1. Vzorky a reagentie musí být vytemperovány na pokojovou teplotu
2. Pipetujeme 50  $\mu$ l (eventuelně 1 kapku přiloženým kapátkem) 0,8 % suspenze diagnostických erytrocytů o známé antigenní struktuře do příslušných mikrozkušavek v gelové kartě s AGH.
3. Přidáme 25  $\mu$ l vyšetřovaného séra nebo plazmy.
4. Inkubujeme 15 minut při 37 °C.
5. Centrifugujeme podle nastaveného času otáček daného výrobce gelového systému.
6. Výsledek odečteme makroskopicky.

## 18. POUŽÍVANÉ METODY V IMUNOHEMATOLOGII

### Hodnocení:

Negativní výsledek: erythrocyty jsou sedimentovány na dně zkumavky

Pozitivní výsledek: erythrocyty jsou na hladině, nebo difúzně rozptýleny.

*Obrázek 14: Gelový systém – sloupcová aglutinace. Zdroj: Presentace Gelový systém*

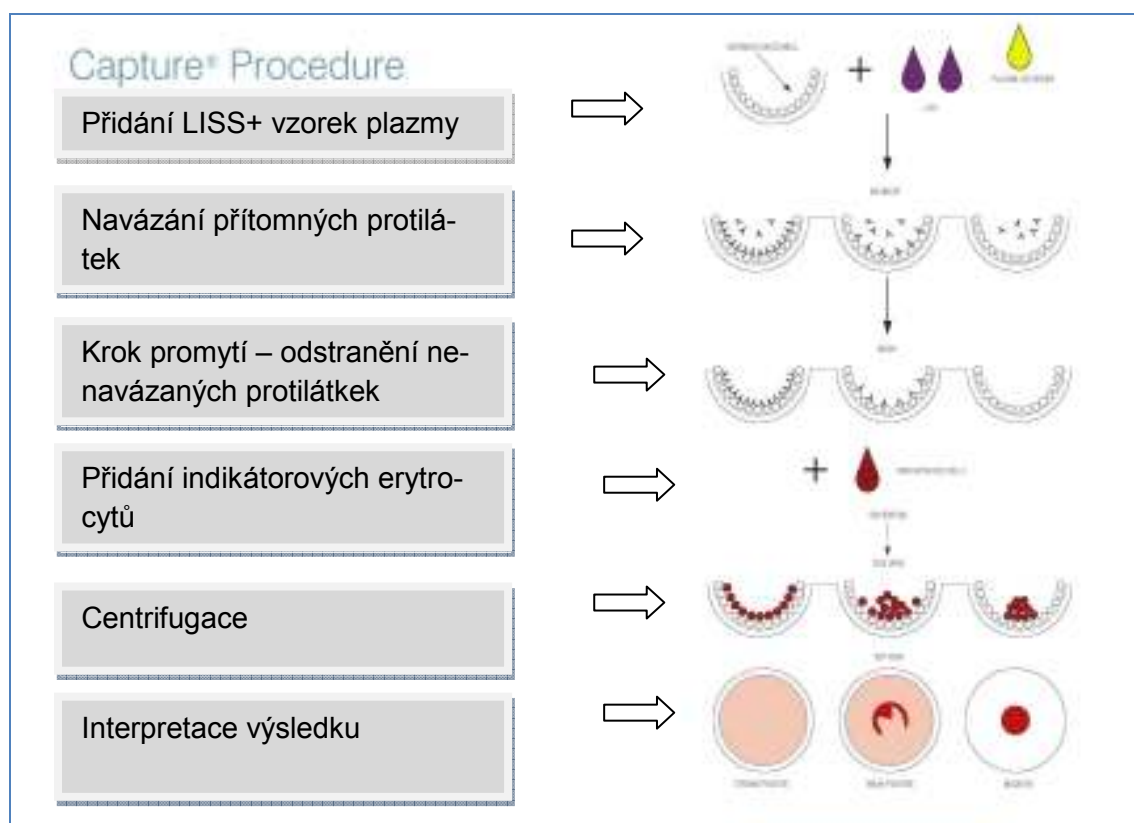


### Capture metoda

Capture-R, metoda pevné fáze, je modifikovanou metodou detekce protilátek. Membrány erythrocytů jsou navázány a vysušeny na povrchu jamek polystyrénových mikrotitračních destiček. Membránové antigeny jsou používány k vazbě specifických antierythrocytárních protilátek, přítomných v plazmě nebo sérech pacientů a dárců. Po krátké inkubaci jsou nenavázané zbytkové imunoglobuliny vyprány z jamek a přidává se suspenze indikátorových erythrocytů s navázanou anti-IgG. Centrifugace vede ke kontaktu indikátorových erythrocytů s protilátkami, vázanými na imobilizované membrány diagnostických erythrocytů. V případě positivity jsou indikátorové erythrocyty zadrženy na dně jamek tím, že na povrchu imobilizované reagenční vrstvy vytvoří pevné anti-IgG-IgG komplexy. Následkem tohoto přemostění se indikátorové erythrocyty připojují ke screeningovým krvinkám jako druhá imobilizovaná vrstva. Naproti tomu v případě nepřítomnosti interakce mezi antigenem a protilátkou (negativní test), nejsou indikátorové erythrocyty zadrženy vazbou při jejich migraci a usadí se uprostřed mikrotitračních jamek jako pevně stmelený, dobře definovatelný terčík. Obrázek 15 znázorňuje popis postupu metody . [24]

## 18. POUŽÍVANÉ METODY V IMUNOHEMATOLOGII

Obrázek 15: Postup vyšetření na pevné fázi: Zdroj: Immucor Ltd.



### 18.3. Doplnující diagnostika a metody pro zvýšení senzitivity AGH testů

#### 18.3.1. Potenciátory

Potenciátory jsou látky, které zesilují interakci antigen-protilátka. Používají se u metod NAT i PAT.

**PEG** (Polyethylene Glycol) je lineární polymer, který odstraňuje molekuly vody z prostoru kolem erytrocytu a usnadňuje tím vazbu protilátky. PEG napomáhá k detekci klinicky významných protilátek a snižuje zachycení klinicky nevýznamných protilátek. PEG může zvyšovat zachycení tepelných autoprotilátek. [7]

**LISS** (Low Ionic Salt Solution) snižuje iontovou sílu prostředí (přibližně 0,03 M) ve srovnání s klasickým solným prostředím (asi 0,17 M) a tím zvyšuje a zesiluje spojení antigen – protilátka. Základní látkou roztoku LISS je obvykle glycin, který chrání erytrocyty před hemolýzou, která by mohla nastat v hypotonickém prostředí. [7]

#### 18.3.2. Enzymatický test

V České republice se používají enzymy bromelin, papain a ficin. Tyto enzymy pomáhají zrušit negativní náboj na povrchu erytrocytů tím, že odstraňují z povrchu bu-

## 18. POUŽÍVANÉ METODY V IMUNOHEMATOLOGII

něčné membrány kyselinu sialovou, a tím snižují zeta potenciál, zvyšuje se počet kontaktních míst pro protilátku a tím se umožňuje připojení specifické protilátky. Rizikem použití enzymu je, že mohou být destruovány či zeslabeny některé antigeny – M, N, Duffy, Xg<sup>a</sup>, JMH. Erytrocyty zpracované enzymaticky také vykazují zvýšenou aglutinabilitu pro IgG molekuly. [7]

Enzymatické testy se již rutinně pro vyšetřování protilátek nepoužívají. Jsou využívány jako metoda doplňující. Dle doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS J.E.P. by měla být používána u pacientů s potransfuzními reakcemi, u polytransfudovaných pacientů a v případech, kdy je žádoucí zvýšit senzitivitu prováděného vyšetření. K provedení nepřímého antiglobulinového testu se využívají komerčně připravené diagnostické erytrocyty s enzymem nebo lze enzym dodatečně přidat k diagnostickým erytrocytům [31]

### 18.4. Speciální diagnostika

V NRL pro imunoheematologii na ÚHKT se používají speciální metody a diagnostika, které napomáhají k identifikaci antierytrocytární protilátky či protilátek.

#### Lewis substance

Lewis substance je určena pro použití jako podpůrný prostředek při identifikaci nepravidelných krevně skupinových protilátek tím, že neutralizuje v séru nebo plazmě protilátky anti-Le<sup>a</sup> a anti-Le<sup>b</sup>.

Lewis substance je přidána ve vhodném poměru k séru nebo k plazmě, obsahující protilátky Lewis. Následné testování erytrocytů s antigeny Le(a+) nebo Le(b+) poskytne negativní reakce. Pokud jsou ve vzorku přítomny další protilátky, neutralizace komponenty/komponent anti-Lewis umožní jejich detekci a identifikaci. [26]

#### P1 substance

P1 substance je přidána ve vhodném poměru k séru nebo k plazmě, obsahující protilátky namířené proti P<sub>1</sub> antigenu. Následné testování erytrocytů s antigenem P<sub>1</sub>+ poskytne negativní reakce. Přítomnost protilátky anti-P<sub>1</sub> lze potvrdit srovnáním reakcí, které poskytl vzorek ošetřený substancí s reakcemi neošetřeného vzorku. Pokud jsou ve vzorku přítomny další protilátky, neutralizace anti-P<sub>1</sub> komponent umožní jejich detekci a identifikaci. [27]



## 18. POUŽÍVANÉ METODY V IMUNOHEMATOLOGII

### EGA souprava

Jméno této komerční speciální metody je vytvořeno ze složekobsažených v tomto roztoku: **EDTA-Glycin-kyselina (Acid)**. EGA souprava se používá k uvolnění tepelných aloprotilátek nebo autoprotilátek typu IgG z erytrocytů za účelem typování antigenů nebo k dalšímu použití při serologickém testování.

Erytrocyty senzibilizované imunoglobuliny, např. při autoimunní hemolytické anémii nebo hemolytickém onemocnění novorozenců, jsou vyšetřeny na PAT s pozitivním výsledkem. Povrchové erytrocytární antigeny nemohou být z tohoto důvodu testovány metodou nepřímého antiglobulinového testu ani s reagenty obsahujícími potenciátory, protože imunoglobuliny vázané na jejich povrchu způsobují za těchto podmínek spontánní aglutinaci. Schopnost uvolnit imunoglobuliny z erytrocytů bez poškození reaktivity povrchových antigenů má velký význam, protože umožní erytrocyty typovat. Otypování antigenů na erytrocytech napomáhá k identifikaci jedné nebo více aloprotilátek vyskytujících se společně s tepelnými autoprotilátkami v sérech pacientů.

Při ošetření erytrocytů tímto reagentem se inaktivují antigeny skupinového systému Kell, stejně jako  $Er^a$ , Bg a eventuálně i další. Tento reagent nedenaturuje antigeny citlivé na enzymy, jako jsou antigeny systémů MNSs a Duffy.

### **18.5. Metody izolace protilátky**

#### Absorpce protilátky

Při izolaci určitých protilátek ze směsi protilátek se nejčastěji používá tzv. metoda vysycování (absorpce). Protilátka se naváže na příslušné antigeny přítomné na erytrocytech. Po kompletním vysycení určitých protilátek poté v séru zůstávají pouze ty protilátky, které mohou být v dalším kroku specificky identifikovány. Při vysycování je nutno splnit některé zásadní předpoklady. U směsi protilátek tepelného typu se musí při vysycení dodržet jejich tepelné optimum. Množství krvinek a doba vysycení je dána povahou protilátek (aviditou), které jsou vysycovány. Krvinky pro vysycování jsou odebírány do antikoagulačního roztoku a zpravidla třikrát promyty v nadbytku fyziologického roztoku. K vysycování je používán jen sediment krvinek zbavený suspenzního prostředí. To je důležité zejména tam, kde je izolována slabá protilátka, kde by při opakovaném vysycování docházelo k nežádoucímu zředění séra a zhoršení možnosti detekce této protilátky. Jsou-li vysycená séra skladována delší dobu, může se po určitém časovém odstupu znovu v malé míře objevit aktivita protilátky, která byla vysycována. [7]

## 19. PRAKTICKÁ ČÁST

### Eluce

Eluční test se provádí za účelem uvolnění protilátek vázaných na erytrocytech. Vazba antigen-protilátka je reverzibilní a tento komplex lze uvolnit pomocí tepelné eluce - při teplotě 56 °C a vyšší či vystavení vysokému nebo nízkému pH. Protilátka přechází do roztoku (eluátu), se kterým se dále pracuje jako s vyšetřovaným sérem.

Eluáty připravené z erytrocytů, na které byly protilátky navázány in vivo nebo in vitro, se používají k několika následujícím účelům:

- a) k identifikaci protilátek vázaných na erytrocyty pacientů, u kterých byl zjištěn pozitivní přímý antiglobulinový test,
- b) k izolaci specifických protilátek ze séra, které obsahuje mnoho protilátek různých specifit, adsorpcí in vitro na cíleně vybrané erytrocyty,
- c) ke stanovení přítomnosti slabě exprimovaných antigenů na erytrocytech, po předchozí inkubaci s cíleně vybranými antiséry. [7]

## 19. PRAKTICKÁ ČÁST

### 19.1. ČETNOST VÝSKYTU PROTILÁTEK

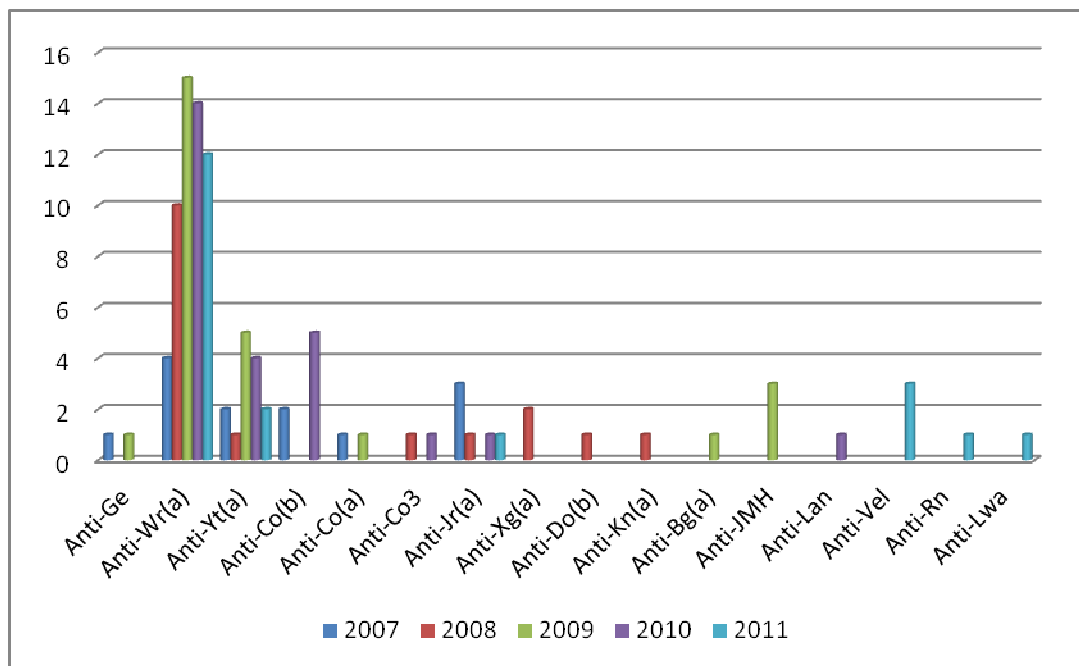
V období 1. 1. 2007 – 31. 12. 2011 bylo v Národní referenční laboratoři pro imunohematologii detekováno 3012 specifických erytrocytárních aloprotilátek. Předmětem této práce je popis a detekce protilátek proti systémům Gerbich, Diego, Yt, Xg, Sciana, Dombrock, Colton, Landsteiner-Wiener, Cromer, Knops, Indian, Ok, John Milton Hagen, HFA a LFA. Z celkového počtu 3012 protilátek bylo zachyceno 102 protilátek (3,38 %) proti jmenovaným systémům.

Záchyt protilátek jsem rozdělila do tabulek a grafů podle jednotlivých skupin.

## 19. PRAKTICKÁ ČÁST

- a) Z celkového počtu 3012 protilátek bylo detekováno 102 (3,38 %) protilátek proti systémům Gerbich, Diego, Yt, Xg, Scianna, Dombrock, Colton, Landsteiner-Wiener, Cromer, Knops, Indian, Ok, John Milton Hagen, HFA a LFA (graf 1, tabulka 18)

Graf 1 Specifita protilátek – vzácné systémy (n=102)



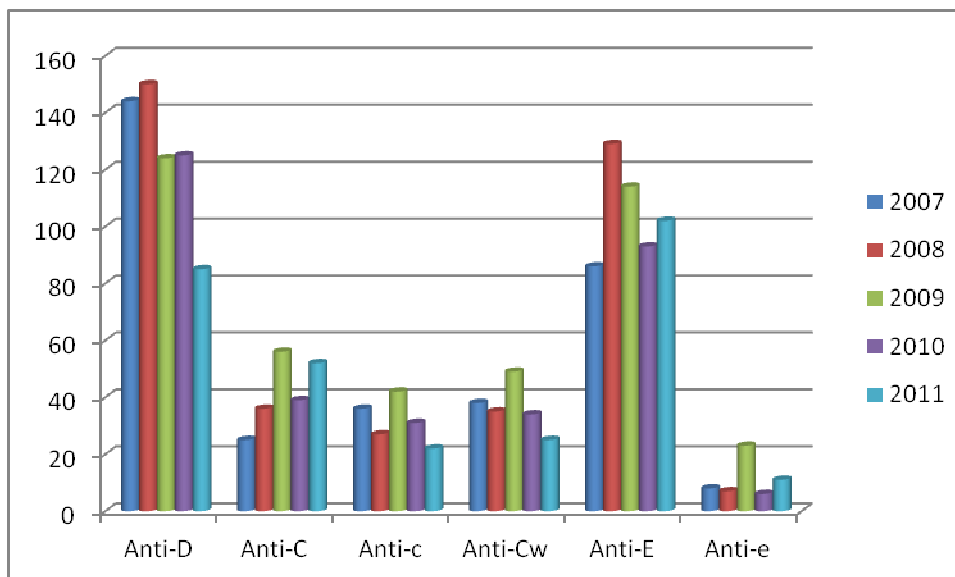
Tabulka 18: Specifita protilátek – vzácné systémy (n = 102)

Protílátka	2007	2008	2009	2010	2011	Celkem
Anti-Ge	1		1			2
Anti-Wr(a)	4	10	15	14	12	55
Anti-Yt(a)	2	1	5	4	2	14
Anti-Co(b)	2			5		7
Anti-Co(a)	1		1			2
Anti-Co3		1		1		2
Anti-Jr(a)	3	1		1	1	6
Anti-Xg(a)		2				2
Anti-Do(b)		1				1
Anti-Kn(a)		1				1
Anti-Bg(a)			1			1
Anti-JMH			3			3
Anti-Lan				1		1
Anti-Vel					3	3
Anti-Rn					1	1
Anti-Lw <sup>a</sup>					1	1

## 19. PRAKTICKÁ ČÁST

- b) Z celkového počtu 3012 protilátek bylo detekováno 1754 (58,2 %) protilátek proti antigenům Rh systému (graf 2, tabulka 19).

*Graf 2: Specifita protilátek – Rh systém*



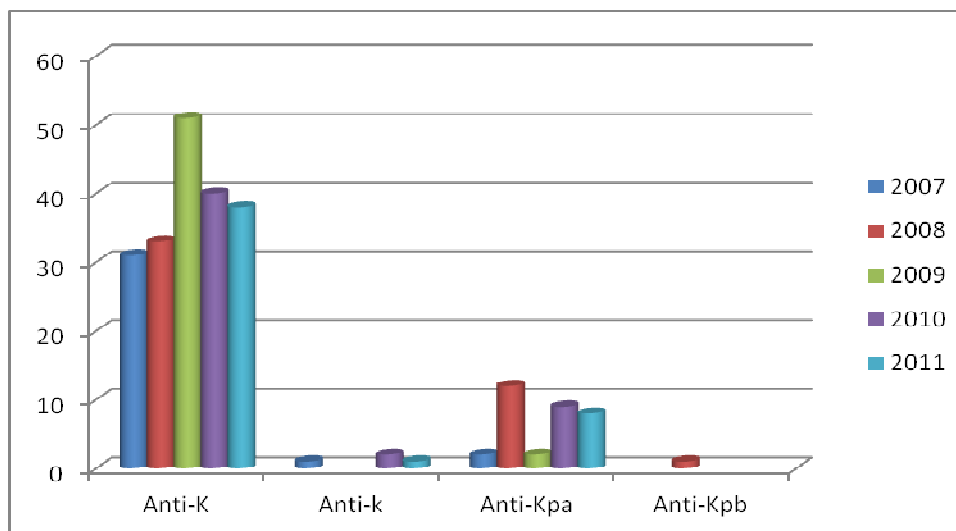
*Tabulka 19: Z Specifita protilátek – proti Rh systému (n = 1754)*

Protilátka	2007	2008	2009	2010	2011	Celkem
Anti-D	144	150	124	125	85	628
Anti-C	25	36	56	39	52	208
Anti-c	36	27	42	31	22	158
Anti-Cw	38	35	49	34	25	181
Anti-E	86	129	114	93	102	524
Anti-e	8	7	23	6	11	55

## 19. PRAKTICKÁ ČÁST

- c) Z celkového počtu 3012 protilátek bylo identifikováno 231 (7,67 %) protilátek proti antigenům systému Kell. (graf 3, tabulka 20)

*Graf 3: Specifita protilátek proti Kell systému (n = 231)*

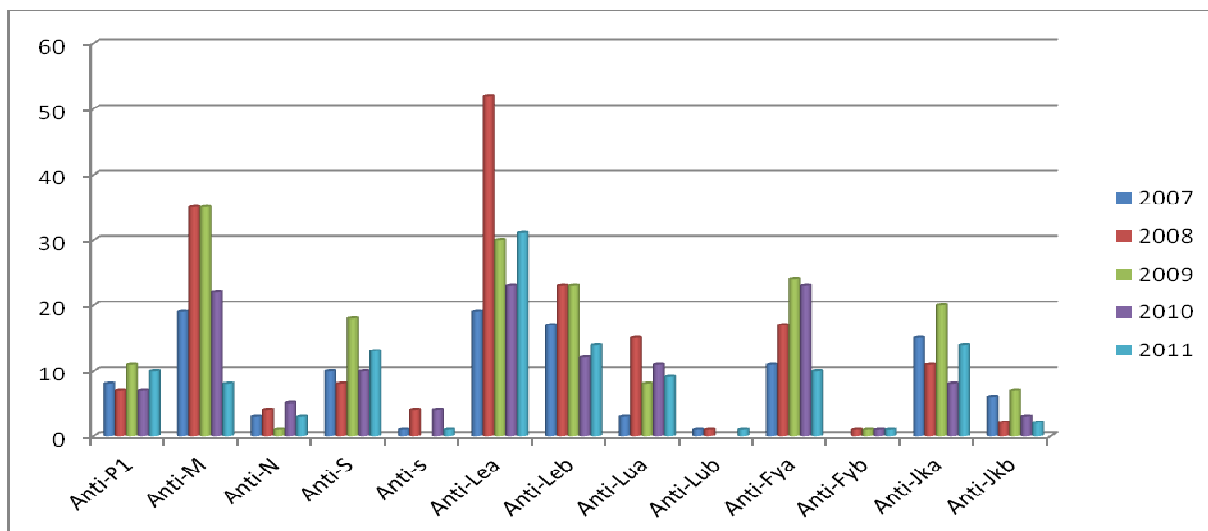


*Tabulka 20: Specifita protilátek proti Kell systému (n = 231)*

Protilátka	2007	2008	2009	2010	2011	Celkem
Anti-K	31	33	51	40	38	193
Anti-k	1			2	1	4
Anti-Kp <sup>a</sup>	2	12	2	9	8	33
Anti-Kp <sup>b</sup>		1				1

d) Z celkového počtu 3012 protilátek bylo identifikováno 789 (26,2 %) protilátek proti antigenům systémů P1, MNSs, Lewis, Lutheran, Kidd. (graf 4, tabulka 21)

*Graf 4: Specifita protilátek proti systémům P1, MNSs, Lewis, Lutheran, Kidd*



*Tabulka 21: Specifita protilátek proti systémům P1, MNSs, Lewis, Lutheran, Duffy, Kidd (n = 789)*

Protilátka	2007	2008	2009	2010	2011	Celkem
Anti-P1	8	7	11	7	10	43
Anti-M	19	35	35	22	8	119
Anti-N	3	4	1	5	3	16
Anti-S	10	8	18	10	13	59
Anti-s	1	4		4	1	10
Anti-Le <sup>a</sup>	19	52	30	23	31	155
Anti-Le <sup>b</sup>	17	23	23	12	14	89
Anti-Lu <sup>a</sup>	3	15	8	11	9	46
Anti-Lu <sup>b</sup>	1	1			1	3
Anti-Fy <sup>a</sup>	11	17	24	23	10	85
Anti-Fy <sup>b</sup>		1	1	1	1	4
Anti-Jk <sup>a</sup>	15	11	20	8	14	68
Anti-Jk <sup>b</sup>	6	2	7	3	2	20

## 19.2. KAZUISTIKY VYŠETŘOVANÉ NA ÚHKT

### 19.2.1. Kazuistika č. 1: anti-Vel

V roce 2009 byl do ÚHKT odeslán vzorek 65-leté pacientky I.M. Jednalo se o pacientku s těžkou formou anémie nejasné etiologie s objektivním nálezem lymfadenopatie. Z anamnézy bylo zjištěno, že pacientka byla 4x těhotná. Během posledních let jí bylo podáno 7 TU erytrocytů. Při předtransfuzním vyšetření byly zachyceny systémem gelové aglutinace rozdílné reaktivity s nejasnou specificitou. V gelových kartách LISS/NAT reagovalo cca 50 % identifikačních erytrocytů na 1+ až 3+. Enzymově ošetřené erytrocyty (v gelových kartách Neutral) měly ve 100 % pozitivní reakce (3+ až 4+). Pro test kompatibility bylo použito 57 TU přípravků erytrocytů, z toho byl pouze jeden kompatibilní.

Na specializovaném pracovišti NRL pro imunohematologii jsme provedli následující testy s uvedenými výsledky:

Stanovení krevní skupiny: A RhD pozitivní

Stanovení fenotypu: C+c+E-e+Cw-K-Fy(a+b+) Jk(a-b+) Le (a-b+) P1-M-N+S+s+

#### 1. krok: screening protilátek

Provedli jsme základní stanovení chladových a tepelných protilátek metodou gelové aglutinace. Výsledek vyšetření byl následující:

Chladové protilátky při 4 °C: NEGATIVNÍ

Tepelné protilátky při 37 °C: POZITIVNÍ

Pozitivní reakce byly zjištěny jak v NAT tak v enzymatickém testu a zároveň také s vlastními erytrocyty v testu NAT.

Tabulka 22: Odečet síly reakcí

Screen	Papain	NAT
I	3+	3+
II	3+	2+
III	3+	2+
IV	3+	1+
Autokontrola	negativní	3+

Obrázek 16: Vyšetření v gelovém systému



## 2. krok: PAT

Na základě pozitivní reakce s vlastními erytrocyty pacienta jsme vyšetřili PAT. Výsledek testu byl **pozitivní**. Proto jsme provedli kvalitativní i kvantitativní vyšetření k určení typu senzibilizace. Dle výsledků zobrazených v tabulce 23 zjišťujeme, že se jedná o protilátky třídy IgG a též aktivaci složkou komplementu.

Tabulka 23: PAT – typ senzibilizace

Anti-IgG	Anti-IgA	Anti-IgM	Anti-C3c	Anti-C3d	Kontrola
1+	negativní	negativní	negativní	4+	negativní

## 3. krok: identifikace protilátek

Provedli jsme identifikaci s vybranými panelovými dárci v solném prostředí, v NAT a s erytrocyty ošetřenými ficinem. Test byl proveden metodou gelové aglutinace.

Obrázek 17: Reakce s panelovými erytrocyty

List1																										Nell		5x 454	
	C	c	Cw	D	E	e	P	M	N	S	s	Lua	Lub	Lea	Leb	K	k	Kpa	Kpb	Fya	Fyb	Jka	Jkb	Wra	NAT	FIC	HOT	74	
27	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	4	4	-	-		
43	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	4	4	-	-		
73	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	4	4	-	-		
93	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	4	4	-	-		
100	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	4	4	-	-	
108	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	Dob-	4	4	-	-	
113	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	4	4	-	-		
118	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	4	4	-	-		
121	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	4	4	-	-		
130	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	4	4	-	-		
133	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	4	4	-	-		
141	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	4	4	-	-		
149	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	4	4	-	-		
150	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	4	4	-	-	
																								4	4	-	-		
																								4	4	-	-		



V NAT testu prokazujeme reakce o síle 0 - 2+, v enzymatickém testu jsou všechny reakce na 3+. V solném prostředí jsou reakce s vybranými erytrocyty také pozitivní 2+ - 3+). V NATu a s naficinovanými erytrocyty pacienta byla zjištěna také pozitivní auto-kontrola.

#### 4. krok: absorpce protilátky a PAT

Abychom zjistili třídu příslušné protilátky, provedli jsme absorpci (při 37 °C, 60 min.) na erytrocyty vybraného panelového dárce. Na tyto erytrocyty se navázala protilátka z vyšetřovaného séra. Třídu protilátky jsme poté prokázali pomocí PAT testu. Nejsilněji reagovala třída IgM, se stopami IgA a IgG a prokázali jsme též aktivaci komplementu. (viz obrázek 18).

Obrázek 18: Určení třídy protilátky



#### 5. krok: chladová absorpce a PAT

Z důvodu prokázání protilátky typu IgM jsme provedli chladovou absorpci s panelovými erytrocyty, která trvala téměř 56 hodin. Pokud je IgM protilátka vysycena, je možné identifikovat přítomnosti další třídy protilátky či komplementu. Proto jsme poté znovu provedli PAT (viz tabulka 24), kde jsme detekovali třídu IgG ve stopovém množství a také aktivovanou složku komplementu. U třídy IgM byl výsledek negativní.

Tabulka 24: PAT po chladové absorpci

PAT	IgG	IgA	IgM	C3c	C3d	Ctrl
2+	(+)	negativní	negativní	negativní	2+	negativní

#### 6. krok: absorpce a screening protilátek

Na základě druhého kroku, kdy jsme zjistili pozitivní PAT test, jsme provedli absorpci autoprottilátky, která překrývala přítomnou alopřilátka. Absorpci jsme provedli s panelovými erytrocyty dárce, které byly ošetřeny ficinem. Erytrocyty byly vždy shodné

s antigenním složením pacienta v Rh, Kell a Kidd systému, aby nedošlo k vysycení protilátky proti jmenovaným systémům a tudíž k falešně negativní reakci. Absorpce protilátky vedla k negativnímu výsledku v NAT testu, nicméně v enzymovém testu přetrvávaly pozitivní reakce (viz tabulka 25).

*Tabulka 25: NAT a enzymatický test po absorpci autoprotilátky*

Screen. erytrocyty	NAT	Fic/NAT
I	Negativní	2+
II	Negativní	2+
III	Negativní	2+
IV	negativní	2+

## **7. krok: testování s panelovými erytrocyty ÚHKT**

*Tabulka 26: Reakce s Vel +erytrocyty*

Panel. erytrocyty		Fic/NAT
150	CCDeeKk	4+
133	ccDEE	3+
113 Vel+	ccddee Le(a+)	4+
130 Vel+	ccddee Lu(a+)	3+
43 Vel slabý	CCwDee	1+

Na základě slabé reaktivity s panelovým dárce č. 43, u kterého je geneticky potvrzen slabý Vel antigen, jsme směřovali další vyšetření k potvrzení anti-Vel protilátky. Anti-Vel protilátky se chová velice variabilně v NAT i v enzymatických testech

V následujících krocích jsme souběžně testovali erytrocyty pacienta, zda jsou Vel negativní (viz krok 8) a zároveň jsme prokazovali pomocí Scarf erytrocyty anti-Vel protilátku (krok9).

## **8. krok: ověření se séry s protilátkami proti HFA**

Abychom vyloučili, že se nejedná o jinou specifickou protilátku než naši předpokládanou anti-Vel, použili jsme séra se známými protilátkami proti HFA antigenům a otypovali testované erytrocyty v NAT testu. Při typování jsme zjistili nepřítomnost Vel antigenu na vyšetřovaných erytrocytech (viz tabulka 26). Další negativní reakce byla zachycena s anti-Zd<sup>a</sup> protilátkou. Předpokládali jsme, že se jedná pravděpodobně o falešně negativní reakce, protože v rámci kontroly může dojít k selhání.

Tabulka 27: Typování erytrocytárních antigenů

Archiv sér	Protilátka	NAT	Kontrola
128	Anti-JMH	1+	1+
135	Anti-Jr <sup>a</sup>	1+	1+
145	Anti-Zd <sup>a</sup>	negativní	Negativní
153	Anti-Vel	negativní	1+
164	Anti-Co3	2+	2+
165	Anti-Yt <sup>a</sup>	+/-	negativní
168	Anti-Lan	2+	2+
186	Anti-Ge	2+	2+
192	Anti-Co <sup>a</sup>	2+	1+
198	Anti-Gy <sup>a</sup>	1+	1+

### 9. krok: ověření Vel- antigenu s dalšími séry s anti-Vel protilátkou

Pro potvrzení, že erytrocyty nenesou Vel antigen, jsme použili více sér s anti-Vel protilátkou a provedli NAT s erytrocyty pacienta i s kontrolními Vel+ erytrocyty (viz tabulka 27).

Tabulka 28: NAT pro potvrzení Vel – patientského vzorku erytrocytů

Sérum č.	Erytrocyty pacienta	NAT	FicNAT	Erytrocyty kontrolní	NAT
171 anti-Vel	Vel-	Negativní	Negativní	Vel+	3+
183 anti-Vel	Vel-	Negativní	Negativní	Vel+	1+
206 anti-Vel	Vel-	Negativní	Negativní	Vel+	3+

### Závěr:

**V séru byla prokázána aloprotilátka anti-Vel.** Pro transfuze bylo doporučeno otypování erytrocytů rodinných příslušníků, vyhledání vhodných dárců v Mezinárodním registru dárců či v budoucnosti kryokonzervaci autotransfuzí.

### 19.2.2. Kazuistika č. 2 : anti-Rd(a)

Těhotná žena, u níž byl pomocí ultrazvukového vyšetření zaznamenán hydrops plodu a zvýšený průtok krve v arteria cerebri media. Z důvodu plánované intraumbilikální transfuze bylo požadováno imunohematologické vyšetření matky.

Laboratorní vyšetření screeningu protilátek (tabulka 28), krevní skupina a fenotyp Rh matky jsou uvedeny níže..

Krevní skupina: A RhD pozitivní

Fenotyp: Ccee Cw-, K-

Tabulka 29: Vyšetření matky

Tepelné protilátky (37 °C, gelová aglutinace DG Gel a Diamed)	Negativní
Chladové protilátky (4 °C)	Negativní
S pupečníkovými ery 0	Negativní
PAT	Negativní

Zjištění specifity protilátky probíhalo v období od 5/2010 – 8/2011. Z důvodu komplikací plodu již během těhotenství byl předán vzorek těhotné ženy k podrobnějšímu otestování na pracoviště NRL pro imunohematologii.

### 1. krok: Screening protilátek

Nejprve byl proveden screening chladových a tepelných protilátek, v obou případech s negativním výsledkem.

Chladové protilátky (4 °C): NEGATIVNÍ

Tepelné protilátky (37 °C): NEGATIVNÍ

Vyšetření tepelných protilátek jsme provedli všemi dostupnými metodami s použitím panelových erytrocytů každého systému, které jsou používány na pracovišti referenční laboratoře (viz tabulka 29 a obrázek 19).

Tabulka 30: Vyšetření gelovými systémy DG Gel, Diamed, Scangel.

Screeningové ery	Sloupcová aglutinace					
	DG Gel		Diamed		Scangel	
	NAT	PAP/NAT	NAT	PAP/NAT	NAT	PAP/NAT
I	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
II	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
III	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
IV	Negat.	Negat.				
Autokontrola	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.

Obrázek 19: vyšetření metodou pevné fáze

Results - Screen						
Sample ID	Interp.	Flags	Screen 1	Screen 2	Screen 3	Pos Ctrl
Babicka	Negative		0	0	0	4+
			*	*	*	

## **2. krok: NAT s erytrocyty panelových dárců**

Vzhledem k tomu, že jsme ve screeningu protilátek obdrželi ve všech případech negativní reakce, provedli jsme následně NAT u vzorku séra s erytrocyty panelových dárců se vzácným antigenním složením. Výsledky reakcí byly ve všech případech negativní (viz tabulka 30).

*Tabulka 31: Reakce s erytrocyty panelových dárců*

Pořadové číslo	Fenotyp	NAT	Fic/NAT
23	CCwDee kk	negativní	negativní
74	ccDEE Le(a+) Kk	negativní	negativní
40	ccddee Lu(a+)	negativní	negativní
10	ccddee	negativní	negativní
52	CCDee Kk	negativní	negativní
72	CcDee Yt(a-)	negativní	negativní

## **3. krok: testování s erytrocyty s přítomností LFA**

Jelikož výsledky dosavadních testů v NAT a enzymatickém testu byly vždy negativní, použili jsme komerčně vyrobené erytrocyty s přítomností antigenů s nízkou frekvencí výskytu o různé specifitě (viz tabulka 31). Ve všech případech byly opět získány výsledky negativní.

*Tabulka 32: Komerční erytrocyty s LFA antigeny*

Komerční erytrocyty s antigenem	NAT	Fic/NAT
ULF	negativní	negativní
Di <sup>a+</sup>	negativní	negativní
Mt <sup>a+</sup>	negativní	negativní
Go <sup>a+</sup>	negativní	negativní
Co <sup>b+</sup>	negativní	negativní
Yt <sup>b+</sup>	negativní	negativní
He+	negativní	negativní
VS	negativní	negativní
Wr <sup>a+</sup>	negativní	negativní

## **4. krok: test kompatibility**

Pomocí testu kompatibility jsme testovali sérum matky s erytrocyty otce dítěte. S použitím testu kompatibility jsme chtěli zjistit protilátku, která by byla zaměřena proti pravděpodobnému antigenu s nízkou frekvencí výskytu, který by se mohl vyskytovat na ery-

trocytech otce, a který by nenarozený novorozenec mohl zdědit (viz tabulka 38 a obrázek 20).

Krevní skupina otce: A RhD pozitivní

Výsledek testu kompatibility byl pozitivní.

*Tabulka 33: Test kompatibility – gelový systém*

Test kompatibility	NAT	FIC/NAT
Sérum matky a ery otce	2+	2+
Sérum otce a ery matky	negativní	

*Obrázek 20: Test kompatibility - capture*

Results - Crossmatch					
Patient ID	Donor ID	Interp.	Flags	IgG XM	Ind Ctrl
Babicka	142-11	IgG Comp (Check ABO *D Comp)		0	3+
Babicka	Kunc	Incompatible *D		3+	4+

### 5. krok: absorpce a PAT

V návaznosti na pozitivní výsledek testu kompatibility jsme provedli absorpci, při které jsme navázali protilátku ze séra matky na erytrocyty otce dítěte.

Následně byl proveden PAT, který prokázal navázání protilátky na erytrocyty matky a bylo určeno, že se jedná o protilátku třídy IgG (viz tabulka 39 a 40).

*Tabulka 34: PAT*

IgG	C3d	ctrl
3+	negativní	negativní

Při určení typu senzibilizace jsme prokázali protilátky podtřídy IgG1, a tudíž klinicky významnou protilátku.

*Tabulka 35: Určení podtřídy IgG protilátky*

IgG1		IgG3			
1:1	1:100	1:1	1:100	ctrl	1:10
1+	-	-	-	-	2+

### 6. krok: test kompatibility

Dále byl proveden test kompatibility v NAT se sérem matky a s erytrocyty nenarozeného dítěte (KS A RhD pozitivní). Jeho výsledek byl též pozitivní (viz tabulka 41).

Tabulka 36: Výsledky testu kompatibility

Test kompatibility	NAT
Sérum matky a ery dítěte	2+

### 7. krok: absorpce protilátky a PAT

Pro zjištění, že se jedná o stejnou třídu protilátky, jsme provedli absorpci protilátky ze séra matky na erytrocyty nenarozeného dítěte. Absorpci protilátky na erytrocyty novorozence jsme ověřili pomocí PAT (viz tabulka 42). Ten prokázal stejnou třídu protilátky IgG

Tabulka 37: PAT

IgG	C3d	ctrl
2+	negativní	negativní

Následně byla zjištěna podtřída protilátky IgG, která byla naabsorbována ze séra matky na erytrocyty otce dítěte. Prokázali jsme opět podtřidu IgG1 (viz tabulka 43).

Tabulka 38: Stanovení podtřídy IgG protiláky

IgG1		IgG3			
1:1	1:100	1:1	1:100	ctrl	1:10
+/-	-	-	-	-	1+

### 8. krok: Test kompatibility

V červenci 2011 se narodilo dítě s pozitivitním PAT 2+. Byly odebrány vzorky matky dítěte, které byly znovu v NRL přetestovány. Test kompatibility jak s otcovými erytrocyty tak i s erytrocyty novorozence byl slabší – reaktivita na 1+ včetně reakce s IgG.

### 9. krok: NAT s erytrocyty s LFA

V červenci 2011 jsme dále pokračovali ve vyhledávání protilátky ze séra matky za pomoci Scarf erytrocytů s prokázanými LFA antigeny (viz tabulka 44 a obrázek 21). Protilátka z vyšetřovaného séra reaguje pozitivně pouze s erytrocyty Rd(a+).

Tabulka 39: NAT s erytrocyty s LFA antigeny

KS	Číslo vzorku	antigen	Výsledek NAT	Kontrola
0	S25	Tr <sup>a</sup>	Negativní	Negativní
0	S26	Cx	Negativní	Negativní
0	S27	Damton	Negativní	Negativní
0	S50	Go <sup>a+</sup>	Negativní	Negativní
0	S57	Rd+	1+	Negativní
0	S58	Sarah	Negativní	Negativní
0	S62	Wd <sup>a+</sup>	Negativní	Negativní
0	S84	Wu+	Negativní	Negativní
0	S103	Rd+	1+	Negativní
0	S104	EPO+	Negativní	Negativní
0	S106	Cad+	Negativní	Negativní
0	S132	Vw+	Negativní	Negativní
0	S135	Dana+	Negativní	Negativní

Obrázek 21: Reakce s erytrocyty s antigeny s nízkou frekvencí výskytu



#### 10. krok : titrace

Provedli jsme titraci a konečný titr byl 4 (viz tabulka 45 a obrázek 22).

Tabulka 40: Titr anti-Rd v NAT testu

NAT	2	4	8
Otec dítěte	+	+/-	-
S103	+	+/-	-

Obrázek 22: Titr anti-Rd testu





### Závěr:

Byla identifikována **specifická aloprotilátka anti-Rd<sup>a</sup>** proti antigenu s nízkou frekvencí výskytu. Tento antigen patří do systému Scianna. Může způsobit středně těžké až těžké hemolytické onemocnění novorozence a to již i během prvního těhotenství.

### 19.2.3. Kazuistika č.3: anti-Lw(a)

69-letá pacientka V.K. léčena pro Ca cervixu a septický stav v malé pánvi. Toto onemocnění bylo doprovázeno těžkou formou anémie. Během hospitalizaci byly plánovány transfuze pro udržení hladiny Hb min. 90 g/l. Pacientka byla polytransfundovaná. Během předtransfuzního vyšetření byly zjištěny protilátky s neznámou specificitou.

Výsledky provedených vyšetření jsou uvedeny níže:

Krevní skupina: 0 RhD negativní

Fenotyp:

Tabulka 41: Fenotyp

D	C	c	Cw	E	e	K	k	Lu <sup>a</sup>	Lu <sup>b</sup>	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	M	N	S	s	P1	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>
-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Kp <sup>a</sup>	Kp <sup>b</sup>
-	+

Chladové protilátky: POZITIVNÍ

PAT: POZITIVNÍ (IgG)/ NEGATIVNÍ (C3d)

Tepelné protilátky: POZITIVNÍ

Na základě pozitivního screeningu protilátek a PAT jsme obdrželi v NRL vzorek s požadavkem na dovyšetření antierytrocytárních protilátek či případně směsi protilátek.

#### 1. krok: screening protilátek

Provedli jsme screening protilátek v NAT a enzymatickém testu pro zjištění tepelné protilátky při 37 °C. Všechny reakce byly pozitivní (viz tabulka 46).

Tabulka 42: Screening protilátek

Screeningové erytrocyty	Fenotyp	NAT	Papainizované erytrocyty
1	R1R1	3+	4+
2	R2R2	3+	4+
3	rr	2+	4+
4	R1R1Cw	2+	4+
Autokontrola	Autokontrola	+/-	1+

## 2. krok: NAT s panelovými erytrocyty

Následně jsme použili erytrocyty speciálních panelových dárců a provedli NAT test. Reakce se všemi vyšetřovanými erytrocyty byly pozitivní (viz tabulka 47).

Tabulka 43: NAT s panelovými erytrocyty

Panelové ery.	Fenotyp	NAT	Fic/NAT
43 slabý Vel	CCwDee	2+	4+
76	ccDEE	2+	4+
120	ccddee Lu(a+)	2+	3+
13	ccddeeMMSS Fyaa Jkaa	2+	3+
147	ccddee Le(a+)	2+	3+
35	ccddee Co(a-)	2+	
53	ccDEe Co(a-)	3+	
72	CcDee Yt(a-)	3+	
Jr(a-)		2+	
Vel-		2+	

## 3. krok: titrace

Provedli jsme titraci s erytrocyty fenotypu ccddee a ccDee v gelové kartě s polyspecifickým AGH pro podezření na anti-D protilátku, na základě výsledků s panelovými D+ erytrocyty ve Fic/NAT a nějakou další nepravidelnou antierytrocytární protilátku (viz tabulka 48).

Tabulka 44: Titrace protilátky s D+ a D- erytrocyty

Titř:	2	4	8	16	32	64
ccddee	2+	1+	(+)	-	-	
ccDee	3+	2+	2+	1+	(+)	-

## 4. krok: test kompatibility

Provedli jsme test kompatibility s erytrocyty o stejném antigenním složení a prokázali přítomnost jiné antierytrocytární protilátky než je anti-D (viz tabulka 49).

Tabulka 45: Test kompatibility s D+ a D- erytrocyty

	NAT	Fic/NAT
ccddee	2+	4+
ccDee	3+	4+

### 5. krok: absorpce a PAT

Pro určení třídy protilátky jsme provedli absorpci s nativními erytrocyty vybraného panelového dárce (ccddee), abychom eliminovali případné navázání anti-D protilátky. PAT testem jsme prokázali, že protilátka je třídy IgG, podtřídy IgG1 (viz tabulka 50 a 51).

Tabulka 46: Určení třídy protilátky

IgG	C3d	ctrl	IgA	IgM	C3c
3+	-	-	-	-	-

Tabulka 47: Určení podtřídy IgG protilátky

IgG1		IgG3			
1:1	1:100	1:1	1:100	ctrl	1:10
1+	-	-	-	-	2+

### 6. krok: absorpce a PAT

Pro odstranění protilátky anti-D, která by zde mohla být přítomna, jsme použili nativní erytrocyty panelového dárce (ccDee). Anti-D protilátka se navázala na D antigen a znovu jsme pomocí PAT testu prokázali, že se taktéž jedná o protilátku třídy IgG, podtřídy IgG1 (viz tabulka 52 a 53).

Tabulka 48: Určení třídy protilátky

IgG	C3d	ctrl	IgA	IgM	C3c
3+	-	-	-	-	-

Tabulka 49: Určení podtřídy IgG protilátky

IgG1		IgG3			
1:1	1:100	1:1	1:100	ctrl	1:10
2+	-	-	-	-	3+

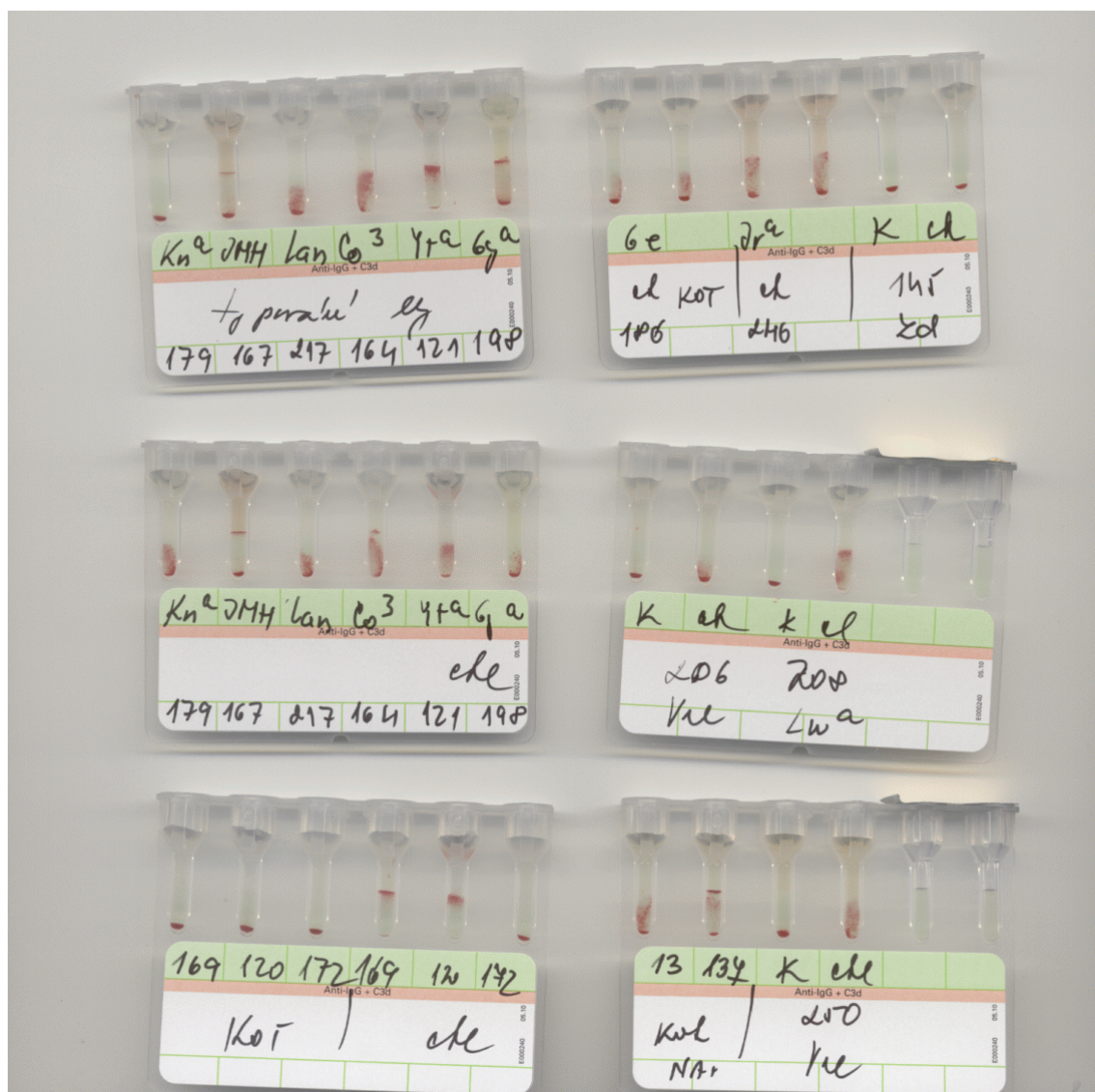
### 7. krok: NAT se séry HFA

Z důvodu, že se navázala protilátka ze séra na panelové erytrocyty dárce s fenotypem ccddee o neznámé specifitě, jsme pokračovali ve vyhledání protilátky a zjištění její identity pomocí NAT testu. K dalšímu testování jsme použili zamražená séra pro otypování HFA antigenů na erytrocytech pacienta. Výsledky testů jsou zobrazeny na obrázku 23 a v tabulce 54.

Tabulka 50: Archiv sér se známou protilátkou s vyšetřovanými erytrocyty

Číslo séra	Protilátka	NAT	Fic/NAT	Kontrola
179	Kn <sup>a</sup>	Negativní		2+
167	JMH	1+		1+
217	Lan	1+		1+
164	Co3	2+		2+
121	Yt <sup>a</sup>	2+	2+	2+
198	Gy <sup>a</sup>	2+		2+
186	Ge	2+		2+
246	Jr <sup>a</sup>	2+		2+
206	Vel	Negativní	2+	2+
208	Lw <sup>a</sup>	Negativní	Negativní	2+
169	Lw <sup>a</sup>	Negativní	Negativní	2+
120	Lw <sup>a</sup> eluát	Negativní	negativní	2+
172	Vel	Negativní		Negativní
145	Zd <sup>a</sup>	Negativní		Negativní
250	Vel	negativní	2+	2+

Obrázek 23: Reakce protilátky o známé specifitě s erytrocyty vyšetřovaného vzorku



Na erytrocytech pacienta jsme prokázali nepřítomnost antigenu Lw(a).

#### 8. krok: absorpce, eluce a NAT

Znovu jsme provedli absorpci (60 minut při 37 °C) na panelové erytrocyty dárce ÚHKT fenotypu ccddee. Naabsorbovanou protilátku jsme elučním testem uvolnili do eluátu. Vysycené sérum a eluát jsme znovu otestovali v NAT s nativními a nacificinovanými krevinkami s antigeny o známé identitě (viz tabulka 55).

Tabulka 51: Testování eluátu

		Vysycené sérum		Eluát
		NAT	Fic/NAT	NAT
43	CCwDee	2+	2+	3+
76	ccDEE Le(a+)	2+	2+	3+
120	ccddee Lu <sup>a</sup>	negativní	negativní	2+
13	ccddee Fy <sup>aa</sup>	negativní	negativní	2+
147	ccddee Le <sup>aa</sup>	negativní	negativní	2+
137	ccDee	1+	2+	3+
Ccddee		negativní	negativní	
ccddEe		negativní	negativní	
ccddee K+		negativní	negativní	

V absorbátu byla vysycena anti-D protilátka a eluát reagoval se všemi testovanými erytrocyty. Díky výběru erytrocytů jsme eliminovali přítomnost protilátek proti antigenům E, C, K.

#### 9. krok: testování eluátu s erytrocyty Lw(a-)

Eluát jsme otestovali s archivem Lw(a-) erytrocyty. Zjistili jsme, že erytrocyty Lw(a-) nereagují s vyšetřovanými eluátem (viz tabulka 56).

Tabulka 52: Testování eluátu s Lw(a-) erytrocyty

			Eluát	
Scarf ery.	KS	Fenotyp	NAT	Fic/NAT
18	A+	Lw(a-b-)	negativní	negativní
P124	A+	Lw(a-)	(+)	Negativní

#### Výsledek:

Byla potvrzena přítomnost **protilátky anti-Lw<sup>a</sup>**, která reaguje zcela negativně s erytrocyty Lw(a-b-) a velice slabě s Lw(a-). Nejedná se o klinicky významnou protilátku, nicméně musí být podávány D negativní transfuzní přípravky.

#### 19.2.4. Kazuistika č.4: anti-Ge

U pacienta J.S. nar. 1946 byly v rámci předtransfuzního vyšetření zachyceny antierytrocytární protilátky pravděpodobně proti antigenu s vysokou frekvencí výskytu.

Primární vyšetření bylo provedeno na pracovišti krevní banky nemocnice Na Homolce a dovyšetřeno na speciálním pracovišti FNKV. Výsledky jsou uvedeny níže (viz tabulka 57 a obrázek 24):



Fenotyp: Ccee, Cw negativní, Kk, Jk(a+b-)

**Tabulka 53: Primární vyšetření testu**

Test	Výsledek
Přímý antiglobulinový test	NEGATIVNÍ
NaCl test (4 °C )	POZITIVNÍ
Enzymatický test v solném prostředí	NEGATIVNÍ
Nepřímý antiglobulinový test	POZITIVNÍ
Autoprotilátková reakce	NEGATIVNÍ

Identifikace na gelovém systému DG Gel prokazuje protilátku, která reaguje se všemi erytrocyty při 37 °C v NAT i při 4 °C v solném prostředí. Test byl negativní s erytrocyty ošetřenými papainem (viz obrázek 24).

**Obrázek 24: Identifikace protilátky pomocí panelového testu**

(2)

ΗΟΚΟΛΡΑ

26/2 07

# Identisera Diana/Extend-Identisera Diana P/Extend P

Antigens table/Tabla de antígenos/Tabela de antígenos/Πίνακας αντιγόνων/Antigenní tabulka/Antigenná tabul'ka/Antigén táblázat/Tabela antygenów/Антигенный профиль панели

	Donor/Donante/ Dador/Δότης/ Dárcu/Дава/ Давца/Донор	Rh Phenotype/Fenotipo Rh/ Φαινότυπος Rh/ Fenotipo Rh/Rh Fenotipus/ Rh-φαινότυπος	Rh-ir					Kell					Duffy					Kidd					Lewis					P					M N S					Luth.					Xg					Special antigens/antígenos especiales Αιχμηρές ειδικές αντιγόνους Václav antigén/antígenos especiales Különleges antigén/antígenos especiales Специальные антигены	Results/Resultados/Rezultády/ Výsledky/Ergebnisse/ Wyniki/Результаты																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
			D	C	E	c	C <sup>+</sup>	K	k	Kp <sup>a</sup>	Kp <sup>b</sup>	Jsa	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	P <sub>1</sub>	M	N	S	s	Lu <sup>a</sup>	Lu <sup>b</sup>	Xg <sup>a</sup>	Xg <sup>b</sup>																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
1	4190831	CCDee R <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+</

Specializované pracoviště pro imunohematologii FN Královské Vinohrady doporučilo vyšetření identity protilátky na pracovišti NRL pro imunohematologii ÚHKT s ohledem na podezření na protilátku proti antigenu s vysokou frekvencí výskytu.

Vzorky jsme obdrželi na NRL a testovali následovně:

### 1. krok: Stanovení chladových protilátek

Vyšetřili jsme vzorek na přítomnost chladových protilátek. Při 4 °C jsme detekovali slabě pozitivní reakce (viz tabulka 58).

Tabulka 54: stanovení chladových protilátek

1	+/-
2	+/-
Vlastní erytrocyty	-
Pupečníkové erytrocyty	+

### 2. krok: screening tepelných protilátek

Provedli jsme vyšetření screeningu tepelných protilátek při 37 °C na systému gelové aglutinace. Prokázali jsme pozitivní reakce pouze v NAT (viz tabulka 59 a obrázek 25).

Tabulka 55: Vyšetření tepelných protilátek v NAT i enzymatickém testu

Screeningové ery.	NAT	Vyšetření v solném prostředí s enzymaticky ošetřenými ery.		NAT
		Papain	Bromelin	Papain
I	2+	negativní	negativní	negativní
II	2+	negativní	negativní	negativní
III	2+	negativní	negativní	negativní
IV	2+	negativní	negativní	negativní
Autokontrola	negativní	negativní	negativní	negativní

Obrázek 25: Metoda pevné fáze.

Results - Extend I										
Sample ID	Interp.	Flags	E-I 1	E-I 2	E-I 3	E-I 4	E-I 5	E-I 6	E-I 7	E-I 8
Suchan	Complete	*	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
Sample ID	Interp.	Flags	E-I 9	E-I 10	E-I 11	E-I 12	E-I 13	E-I 14	Pos Ctrl	Neg Ctrl
Suchan	Complete	*	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	0

Sloupcová aglutinace i metoda pevné fáze prokázaly, že protilátka je reaktivní pouze v NAT testu.

### 3. krok: vyšetření s panelovými erytrocyty

Vzorek jsme otestovali pomocí NAT testu s panelovými erytrocyty se specifickým fenotypem (viz tabulka 60). Prokázali jsme reaktivitu se všemi panelovými dárci erytrocytů.

Tabulka 56: Vyšetření vzorku séra se specifickými erytrocyty v NAT testu

	Fenotyp	NAT
35	ccddee Co <sup>a-</sup>	2+
50	ccDEe Co <sup>a-</sup>	2+
72	CcDee Yt <sup>a-</sup>	2+
123	ccddee Lea <sup>+</sup>	2+
126	ccddee Lua <sup>+</sup>	2+
	CCDee Jr(a-)	2+

### 4. krok: typování antigenů

Následně jsme dotypovali antigeny na erytrocytech pacienta.

Tabulka 57: Fenotyp

D	C	c	Cw	E	e	P1	M	N	S	s	K
4+	4+	4+	-	-	4+	-	4+	3+	-	3+	4+

k	Kp <sup>a</sup>	Kp <sup>b</sup>	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	Lu <sup>a</sup>	Lu <sup>b</sup>	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	JK <sup>a</sup>	JK <sup>b</sup>	ctrl
3+	-	3+	-	3+	-	4+	-	3+	4+	-	-

### 5. krok: vyšetření se vzorky sér se známou protilátkou

Protože jsme měli podezření na protilátku proti HFA antigenu, použili jsme archiv sér ÚHKT se vzácnými protilátkami k otypování antigenů HFA na erytrocytech pacienta. Jelikož jsme zjistili, že erytrocyty pacienta jsou Vel negativní, předpokládali jsme, že se může jednat o anti-Vel protilátku (viz tabulka 62).

Tabulka 58: Vyšetření vzorků se séry se známou protilátkou

		NAT	Kontrola
120	Lw <sup>a</sup> eluát	4+	4+
128	JMH	Negativní	1+
159	Ku eluát	3+	3+
169	Lw <sup>a</sup> eluát	1+	2+
183	Vel eluát	Negativní	2+
	-Co3	4+	3+
171	Vel eluát	negativní	3+



#### **6. krok: vyšetření s Vel - erytrocyty**

Sérum pacienta jsme otestovali s Vel negativními erytrocyty. Nicméně pozitivní reaktivitou v NAT testu s Vel - erytrocyty jsme vyloučili přítomnost anti-Vel protilátky (viz tabulka 63).

*Tabulka 59: Vyšetření Vel – erytrocyty*

	NAT
P90	3+
P95	3+
S141	3+
S176	3+
S179	3+

#### **7. krok: vyloučení systému Kell pomocí EGA kitu**

Pro vyloučení systému Kell jsme provedli tzv. egaci panelových erytrocytů. Pomocí komerčního EGA kitu jsme odstranili systém Kell z membrány erytrocytů. Sérum jsme otestovali s EGA opracovanými erytrocyty v NAT testu. V případě negativního výsledku by se mohlo jednat o protilátku proti systému Kell. Pozitivní reakce ovšem vylučuje přítomnost specifické protilátky proti systému Kell (viz tabulka 64).

*Tabulka 60: Vyšetření vyloučení protilátky proti Kell systému*

ÚHKT panelové ery + EGA	NAT
91	2+
92	2+
97	2+
146	2+
25	2+

#### **8. krok: vyšetření s erytrocyty se specifickými antigeny**

Pro vyhledání identity protilátky jsme použili erytrocyty Scarfu o různé antigenní struktuře a otestovali jsme je se sérem pacienta v NAT testu (viz tabulka 65). Tímto vyšetřením jsme ovšem neprokázali žádnou negativní reakci, díky níž bychom zjistili, že přítomná protilátka by nereagovala s antigenem, který na erytrocytech chybí.

Tabulka 61: Vyšetření s erytrocyty se specifickými antigeny.

Označení	Krevní skupina	Antigeny	Výsledek NAT
S28		Cs(a-)	3+
S29	A	Jk(a-b-)	3+
S41	A	Er(a-)	3+
S48	0	Lan-	2+
S65	B	U-	2+
S87	B	Cr(a-)	3+
S116	0	Jo(a-)	3+
S124	0	JMH-	3+
S145	0	AnWj-	2+

### 9. krok: neutralizace protilátek

Dalším krokem jsme chtěli prokázat či vyloučit protilátky proti systémům P a Lewis pomocí neutralizace protilátek substancí daného systému. Výsledek byl opět pozitivní, což znamená, že vzhledem k tomu, že protilátky proti systému Lewis či P nebyly přítomny, nemohly být tudíž neutralizovány (viz tabulka 66).

Tabulka 62: Výsledky vyšetření po provedení testu s P a Lewis substancí

Číslo panel. ery	Fenotyp	Reakce po použití substancí		Kontrola
		P substance	Lewis substance	
91		2+	2+	2+
92	ccDEE Jk <sup>b</sup>	2+	2+	2+
97		2+	2+	2+
146	Jk <sup>b</sup>	2+	2+	2+
25	Cw, Lu <sup>a</sup> , Kp <sup>a</sup>	2+	2+	2+

### 10. krok: test kompatibility

Pro plánovanou absorpci protilátky na dárcovské erytrocyty jsme neměli zcela shodného dárce s pacientem. Proto jsme vybrali dva D negativní dárce odlišné v systému S a Kidd. V testu kompatibility jsme zjistili reaktivitu protilátky s panelovými dárci o fenotypu (viz tabulka 67).

Tabulka 62: Test kompatibility se specifickými erytrocyty

ÚHKT panel. ery.	Fenotyp	NAT	Fic/NAT
144	ccddee P-MNssFy <sup>aa</sup> Jk <sup>bb</sup>	3+	(+)
83	ccddee P-MNSSLe <sup>a</sup> Fy <sup>aa</sup> Jk <sup>aa</sup>	3+	3+

### 11. krok: Absorpce protilátky

Vzhledem k pozitivnímu testu kompatibility jsme provedli absorpci s vybraným panelovým dárce se silnější reakcí ve Fic/NAT (ccdde P- MM SS Le<sup>a</sup> Fy<sup>aa</sup> Jk<sup>aa</sup>) po dobu 20 min. při 37 °C.

Po absorpci jsme pomocí PAT zjistili třídu a podtřídu přítomné protilátky (viz tabulka 68 a 69). Protilátka byla naabsorbována na erytrocyty panelového dárce.

Tabulka 63: PAT test

PAT	Ctrl	IgG
3+	negativní	3+

Tabulka 64: Zjištění typu protilátky a podtřídy IgG

IgG1		IgG3			
1:1	1:100	1:1	1:100	ctrl	1:10
4+	1+	negativní	negativní	negativní	3+

### 12. krok: absorpce protilátky, NAT, eluce

Provedli jsme absorpci protilátky na erytrocyty druhého panelového dárce (ccdeekk Fy<sup>aa</sup>Jk<sup>bb</sup>Lu<sup>b+</sup> Le<sup>b+</sup>NNss). Poté jsme provedli NAT test, který byl negativní. Zároveň jsme provedli eluční test a protilátka navázaná na erytrocyty příslušného dárce se uvolnila do eluátu. Přítomnost protilátky v eluátu jsme potvrdili díky pozitivním reakcím v NAT testu (viz tabulka 70).

Tabulka 65: Test NAT se vzorkem vysyceného séra a eluátu

	Vysycené sérum		Eluát
	NAT	Fic/NAT	NAT
Panelové eryt.	negativní	negativní	3+
Dcera	negativní	negativní	
Screen			
91	negativní	negativní	3+
92	negativní	negativní	3+
97	negativní	negativní	3+
146	negativní	negativní	3+
25	negativní	negativní	3+

Výsledky prokázané v tomto kroku vedou k podezření na protilátku proti antigenu s vysokou frekvencí výskytu.

### 13. krok: vyšetření na další protilátky

Eluát jsme dál použili pro další identifikaci. Zjistili jsme, že eluát nereaguje s Gerbich negativními erytrocyty. Tento test prokázal, že se jedná o anti-Ge protilátku (viz obrázek 26).

Obrázek 26: Otestování eluátu s erytrocyty se známými antigeny

Searf :		NAT				NAT	N	NAT
P 90 JHH-	+			S <sub>4</sub> J <sub>1</sub> (b)	+	S <sub>148</sub> J <sub>1</sub> <sup>a-</sup>	+	
P 129 JHH-	+			S <sub>7</sub> Se <sup>1</sup>	+	S <sub>150</sub> J <sub>1</sub> <sup>a-</sup>	+	
S 153 JHH-	+			S <sub>10</sub> Te(a-)	+	S <sub>152</sub> Ge	-	
S 195 JHH-	+			S <sub>16</sub> K- <del>7</del>	+	S <sub>167</sub> J <sub>1</sub> <sup>a-</sup>	+	
S 201 JHH-	+			S <sub>17</sub> Rhnull	+	S <sub>168</sub> R <sub>0</sub>	+	
S 11 K <sub>1</sub> <sup>a-</sup>	+			S <sub>18</sub> Lu(a-b-)	+	S <sub>169</sub> R <sub>0</sub>	+	
S 12 L <sub>1</sub> (a-b)	+			S <sub>19</sub> hr <sup>s</sup>	+	S <sub>160</sub> Co-	-	
S 20 In(b)	+			S <sub>21</sub> Tja-	+	S <sub>169</sub> Co-	-	
P 143 Co <sub>3</sub>	+			O 61 K <sub>1</sub>	+			

### 14. krok: titrace anti-Ge

Provedli jsme titraci určené anti-Ge a prokázali její sílu v titru 64 (viz tabulka 71).

Tabulka 66: Titrace anti-Ge protilátky v NAT testu

2	4	8	16	32	64	128
2+	2+	2+	1+	1+	+/-	-

### 15. krok: otestování rodinných příslušníků

V důsledku faktu, že se jedná o protilátku proti antigenu HFA, jsme otestovali nejbližší rodinné příslušné (viz tabulka 72). Zjistili jsme, že jediným možným dárce je sestra pacienta.

Tabulka 67: Test kompatibility s rodinnými příslušníky

	KS	Fenotyp	Test kompatibility s J.S.
Pacient J.S.	AB+	CcDee Kk Cw-	
Dcera E.S.	B+	CcDee kk Cw	2+ inkompatibilní
Sestra J.V.	AB+	CcDee Kk Cw	Kompatibilní
Dcera V.Ž.	AB+	CCDee kk Cw	2+ inkompatibilní

### Výsledek:

**Byla prokázána aloprotilátka anti-Ge.** Jedná se o protilátku proti antigenu s vysokou frekvencí výskytu. Podtřída protilátky je IgG1, klinicky závažná. Bylo prokázáno, že sestra pacienta J.S. je rovněž Ge-, u ní ale nebyla anti-Ge protilátka prokázána. Mohla by být vhodným dárce. Na základně zkušeností z minulého záchyty protilátky anti-Ge u jiného pacienta, u kterého došlo k výraznému nárůstu titru po podání Ge + transfuze, anti-Ge protilátka může vyvolat pozdní hemolytickou potransfuzní reakci.

### 19.2.5. Kazuistika č. 5: anti-Wr(a)

U dárkyně krve M.N. byl prokázán pozitivní screening protilátek (viz tabulka 73 a obrázek 27).

Krevní skupina: 0 RhD pozitivní

Screening + identifikace protilátek

Chladové protilátky 20 °C - NEGATIVNÍ

Tepelné protilátky 37 °C – POZITIVNÍ

Tabulka 68: Screening tepelných protilátek

Screeningové erytrocyty	NAT	Bromelin
I	negativní	negativní
II	negativní	negativní
III Lu(a+)	2+	negativní

Identifikací s komerčně vyrobenými erytrocyty byla zjištěna protilátka anti-Lu(a) a pravděpodobně také přítomnost protilátky anti-Wr(a).

Obrázek 27: Identifikace protilátky erytrocyty systému EXBIO

Rh-Hr		ID		C D E c e C <sup>+</sup> e <sup>+</sup> f V K k Kp <sup>a</sup> Kp <sup>b</sup> Js <sup>a</sup> Js <sup>b</sup> Fy <sup>a</sup> Fy <sup>b</sup> Jk <sup>a</sup> Jk <sup>b</sup> Le <sup>a</sup> Le <sup>b</sup> P <sup>a</sup> P <sup>b</sup> M N S s Lu <sup>a</sup> Lu <sup>b</sup> Xg <sup>a</sup> Xg <sup>b</sup>																												DT		CT-RP																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
1	R <sub>1</sub> <sup>a</sup> R <sub>1</sub>	313761	+	+	0	0	+	+	/	/	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												</

Vzorek byl odeslán do referenční laboratoře ÚHKT k potvrzení identifikace protilátky anti-Lu<sup>a</sup>, anti-Wr<sup>a</sup> a reaktivitou s panelovou krvinkou č. 14.

### 1. krok: screening chladových a tepelných protilátek

Nejprve jsme provedli screening chladových a tepelných protilátek (tabulka 74 a 75).

Tabulka 69: Chladové protilátky 4 °C v solném prostředí

1	negativní
2	negativní
Autokontrola	negativní
Pupečníkové erytrocyty	negativní

Tabulka 70: Tepelné protilátky 37 °C

Screeningové erytrocyty	NAT	Papain. erytrocyty v solném prostředí
1	negativní	negativní
2	negativní	negativní
3	negativní	negativní
4	negativní	negativní
Vlastní erytrocyty	negativní	negativní

Komerční screeningové erytrocyty neobsahují ani antigen Lu(a+) ani antigen Wr(a+). Z tohoto důvodu je výsledek testu negativní.

### 2. krok: identifikace protilátek

Provedli jsme identifikace komerčními panelovými erytrocyty na gelovém systému DG Gel (viz obrázek 28).



Obrázek 28: Identifikace na systému DG Gel.

Identisera Diana/Extend-Identisera Diana P/Extend P																													
Antigens table/Tabla de antígenos/Tabela de antígenos/Πίνακας αντιγόνων/Antigenní tabulka/Antigénna tabul'ka/Antigén táblázat /Tabela antygenów/Антигенный профиль																													
	Donor/Donante/ Dador/Δότης/ Dárcs/Darcs/ Давца/донор	Rh Phenotype/Fenotipo Rh/ Φαινότυπος Rh/ Fenotip Rh/Rh fenotipus/ Rh-фенотип	Rh-ir					Kell					Duffy		Kidd		Lewis		P	M N S					Luth.		Xg	Special antigens/Antígenos especiais Antígenos especiais Ειδικοί αντιγόνοι Václavské antigény/Václavské antigény Különleges antigének/Antígenos especiais Специальные антигены	Results/Resultados/ Výsledky/Ergebnisse Wyniki/Результаты
			D	C	E	c	e	C*	K	k	Kp*	Kp*	Js*	Js*	Fy*	Fy*	Jk*	Jk*	Le*	Le*	P <sub>1</sub>	M	N	S	s	Lu*	Lu*		
1	3133957	CCDee R <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	nt	+	0	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	+	1	—
2	0231035	Ccddee r'r	0	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	2	—
3	3689094	ccDee R <sub>0</sub> r	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	nt	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	3	—
4	0492545	ccddEe r''r	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	nt	+	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	4	—
5	3084490	ccDEE R <sub>2</sub> R <sub>2</sub>	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	nt	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	5	—
6	0219045	C*CDDee R <sub>1</sub> *R <sub>1</sub>	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	nt	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	6	—
7	3697801	ccddeee rr	0	0	0	+	+	0	+	+	0	+	nt	+	+	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	7	—
8	1294997	ccddeee rr	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	nt	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	8	—
9	0173543	ccddeee rr	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	9	—
10	0214900	ccddeee rr	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	10	—
11	0145607	CCDee R <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	+	+	0	0	+	0	0	+	+	+	nt	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	11	—
12	0505646	ccddeee rr	0	0	0	+	+	0	+	+	0	+	nt	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	12	—
13	4025521	ccDEE R <sub>2</sub> R <sub>2</sub>	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	nt	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	13	—
14	0450759	CCDee R <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	nt	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	14	—
15	3088552	CCDee R <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	nt	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	15	—

Identifikaci jsme potvrdili detekce anti-Lu<sup>a</sup> protilátky. Komerční erytrocyty běžně nemají na svém povrchu antigen Wr(a+).

### 3. krok: identifikace anti -Wr<sup>a</sup>

Jelikož vyšetření primární laboratoře poukazovalo na přítomnost anti-Wr<sup>a</sup> protilátky, použili jsme komerčně vyrobené Wr(a+) a panelové erytrocyty a protilátku anti-Wr<sup>a</sup> jsme rovněž zachytili (viz tabulka 76).

Tabulka 71: Potvrzení přítomnosti anti-Wr<sup>a</sup> protilátky s Wr(a+) erytrocyty

	NAT	Fic/NAT
Wr(a+) erytrocyty komerční	1+	
Wr(a+) panelové erytrocyty	2+	2+

### Výsledek:

**Byly prokázány protilátky anti-Lu<sup>a</sup> a anti-Wr<sup>a</sup>.** Komerčně vyráběné erytrocyty obvykle nenesou Wr(a+) antigeny. Tento antigen se převážně vyskytuje u původních obyvatel Ameriky.

### 19.2.6. Kazuistika č.6 : anti-Yt(a)

Během těhotenství byly u pacientky M.G. prokázány antierytrocytární protilátky neznámé specifity. Pacientka byla již 3x těhotná, z toho 2x byla provedena interrupce. Dle její anamnézy ji nebyla podána transfuze krve.

Krevní skupina: 0 RhD negativní

Fenotyp: ccddee K negativní

PAT: negativní

Tepelné protilátky: POZITIVNÍ

Vzorek pacientky byl předán k přešetření do NRL ÚHKT.

### **1. krok: screening chladových a tepelných protilátek**

Základní vyšetření antierytrocytárních protilátek ukázalo následující výsledky:

Chladové protilátky 4 °C - NEGATIVNÍ

Tepelné protilátky 37 °C POZITIVNÍ v NAT testu (viz tabulka 77 a obrázek 29)

*Tabulka 72: Vyšetření tepelných protilátek 37 °C*

Screeningové erythrocyty	NAT	PAP v solném prostředí
1	1+	negativní
2	1+	negativní
3	1+	negativní
4	1+	negativní
Vlastní erythrocyty	negativní	negativní

*Obrázek 29: Vyšetření tepelných protilátek v systému DG Gel*



### **2. krok: vyšetření s panelovými dárči ÚHKT**

Použili jsme erythrocyty panelových dárců ÚHKT a otestovali je se sérem vzorku zku-mavkovou metodou při 4 °C a na gelovém systému při 37°C. Se všemi erythrocyty v NAT testu byly reakce pozitivní a s ficinovými erythrocyty byly reakce slabě pozitivní i negativní (viz tabulka 78 a obrázek 30).



Tabulka 73: Testování vzorku se specifickými panelovými erytrocyty

Panelový dárci erytrocytů	4 °C zkumavka	NAT sloup.aglut.	Fic/NAT sloup.agl.
25	negativní	1+	Negativní
92	negativní	1+	1+
11 ccddee Le(a+) Kk	negativní	1+	Negativní
98 ccddee	negativní	2+	1+
81 CCDee	negativní	2+	1+
Vlastní erytrocyty	negativní	negativní	

Obrázek 30: Testování vzorku séra s panelovými erytrocyty.



### 3. krok: vyšetření séra s erytrocyty se specifickými antigeny

V dalším kroku jsme použili Scarf erytrocyty, které jsme otestovali se sérem pacienta pro další vyhledání neznámé protilátky. První negativní reakce byla s erytrocyty Yt(a-). Použili jsme další dva vzorky s Yt(a-) se stejným negativním výsledkem (viz tabulka 79).

Tabulka 74: Testování se specifickými erytrocyty v NAT testu

Scarf erytrocyty	Antigeny	NAT	Kontrola
35	ccddee Co(a-)	1+	
53	ccDEeCo(a-)	1+	
72	CcDee Yt(a-)	negativní	
	Jr <sup>a-</sup>	1+	
121	Yt <sup>a-</sup>	Negativní	3+
216	Yt <sup>a-</sup>	Negativní	3+

### Závěr:

**Byla prokázána aloprotilátka anti-Yt<sup>a</sup>.** Yt(a) protilátka nezpůsobuje HON.

### 19.2.7. Kazuistika č. 7: anti-Jr(a)

Po prvním porodu byly u pacientky O.P. prokázány slabě pozitivní nespecifické antierytrocytární protilátky. U novorozence byl z pupečníkové krve zaznamenán PAT o síle 1+. Během druhého těhotenství při vyšetření imunohematologického screeningu byly detekovány reakce se všemi panelovými erytrocyty, jak v NAT tak i s ficinem ošetřenými erytrocyty.

V NRL laboratoři pro imunohematologii jsme provedli následující vyšetření k identifikaci protilátky:

Krevní skupina: 0 RhD pozitivní

Fenotyp: CCeekk

#### 1. krok: screening protilátek

PAT: NEGATIVNÍ

Tepelné protilátky při 37 °C: POZITIVNÍ

Enzymatické reakce: POZITIVNÍ

Autokontrola: NEGATIVNÍ

#### 2. krok: absorpce protilátky a PAT

Jelikož jsme během základního screenigového vyšetření detekovali pozitivní reakce se všemi erytrocyty, provedli jsme absorpci protilátky na ficinem ošetřené vybrané panelové erytrocyty. Pomocí PAT testu jsme potvrdili navázání protilátky ze séra na erytrocyty.

PAT test: POZITIVNÍ na 3+

Pomocí naabsorbované protilátky na erytrocyty jsme určili, že se jedná o protilátku typu IgG. Předpokládali jsme, že podtřída protilátky bude pravděpodobně IgG2 nebo IgG4, jelikož s oběma podtřídami IgG1 i IgG3 byly výsledky negativní (viz tabulka 80).

Tabulka 75: Určení podtřídy IgG protilátky

IgG1		IgG3			IgG
1:1	1:100	1:1	1:100	ctrl	1:10
-	-	-	-	-	2+

#### 3. krok: NAT s erytrocyty se specifickým antigenním složením

Pro další testování jsme použili zamražené erytrocyty 0+ a otestovali jsme je se sérem pacienta v NAT testu (viz tabulka 81). Pouze s erytrocyty Jr(a-) byla detekována nega-

tivní reakce. Ostatní erytrocyty měly na svém povrchu antigen Jr(a+), jelikož se jedná o antigen s vysokou frekvencí výskytu.

*Tabulka 76: Vyšetření vzorek séra se specifickými erytrocyty*

Číslo	Fenotyp	NAT
4	CcD <sup>u</sup> ee	2+
10	ccddee	2+
21	Ccddee	2+
40	ccddee Lu(a+)	2+
115		2+
116	ccDee	2+
130	ccddee	2+
S131	0+ CCDeekk Jr(a-)	Negativní
S145	AnWj-	2+
S170	Hy-	1+
S198	Mars+ Awis-	2+
S202	UIL-	2+
S211	Raph-	2+
S212	Lan-	2+

#### **4. krok: titrace**

Pro průkaz síly protilátky jsme provedli titraci anti-Jr(a) protilátky (viz tabulka 82).

*Tabulka 77: Titrace anti-Jr(a) protilátky*

	2	4	8	16	32	64	128	256	512
NAT	2+	2+	2+	2+	2+	1+	1+	-/+	-

#### **Závěr:**

V séru pacientky byla prokázána **aloprotilátka anti-Jr(a) v titru 128**. Protilátka je buď podtřídy IgG2 nebo IgG4. Pacientce byla doporučena kryokonzervace autotransfuzí, které již byly použity jak pro její vlastní potřeby, ale i pro jinou pacientkou se stejnou protilátkou.

## 20. DISKUZE

Protilátky proti systémům Diego, Yt, Xg, Scianna, Dombrock, Colton, Landsteiner-Wiener, Gerbich, Cromer, Knops, Indian, Ok, John Milton Hagen a protilátky proti antigenům s vysokou nebo nízkou frekvencí výskytu jsou detekovány v naší republice vzácně. Výskyt některých antigenů na membráně erytrocytů má spojitost s etnickým původem jedinců. Např. Diego systém se vyskytuje převážně u původních obyvatel amerického kontinentu. Radin antigen byl převážně detekován na erytrocytech populace lidí etnické skupiny Židů, černochoů či původních obyvatel Ameriky. Zvýšený výskyt protilátek proti vysokofrekventnímu antigenu Gregory (Gy) ze systému Dombrock byl zaznamenán u jedinců české národnosti.

Specifitu protilátek lze potvrdit pouze na speciálních pracovištích, která jsou součástí transfuzních oddělení fakultních nemocnic nebo v Národní referenční laboratoři pro imunohematologii Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze.

Specializovaná pracoviště transfuzních oddělení, ale především NRL pro imunohematologii, mají možnost využít rozšířených a speciálních metod pro detekci komplikovaných případů, např. pro záchyt nepravidelných antierytrocytárních protilátek.

V praktické části jsou popsány rutinně používané a speciální metody, které se používají ke zjištění specifity antierytrocytární protilátky. Jednotlivé kazuistiky ukazují postup krok za krokem, který vedl k určení identity protilátky. Časová náročnost určení identity protilátky proti HFA nebo LFA je velice rozdílná.

NRL pro imunohematologii disponuje archivem sér se vzácnými protilátkami a souborem zamražených erytrocytů získaného z mezinárodního Scarfu (Serum, cells & rare fluids exchange), ale již i z vlastních zdrojů. Dlouhodobými zkušenostmi záchytu protilátek, poznání o jejich reaktivitě v různých systémech může být identita protilátky zjištěna velmi rychle. Zkušenosti, použití citlivé technologie, speciální metody a mezinárodní spolupráce napomáhají k rychlému zajištění hemoterapie u komplikovaných pacientů.

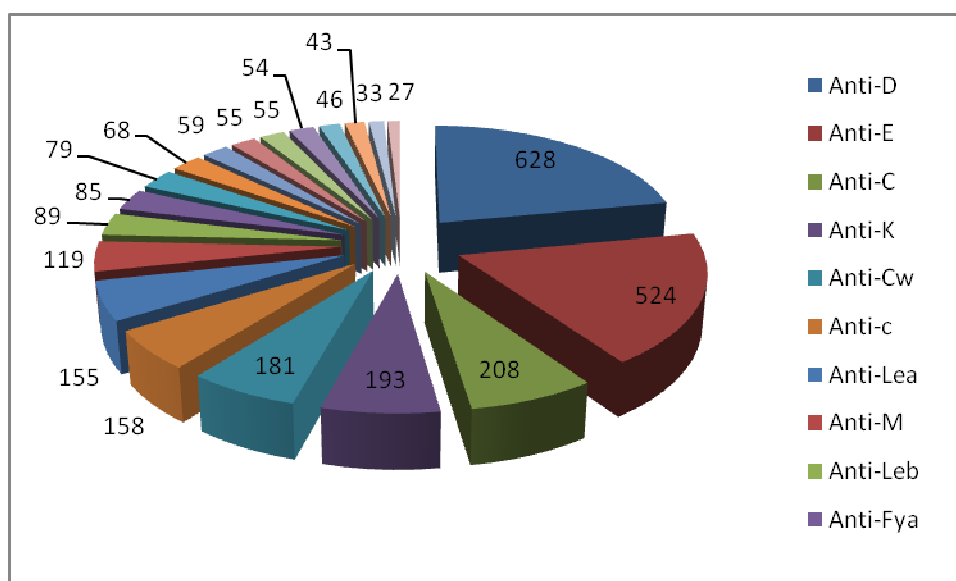
Již při předpokladu, že se jedná o protilátku proti antigenům s vysokou frekvencí výskytu, je doporučováno přednostně provést odběry pro autotransfuzi. V doporučených postupech je poté provést autotransfuzi, kryokonzervace a vyhledávat možnost odběru krve u rodinných příslušníků.

## 21. ZÁVĚR

Záchyt a určení specifity antierytrocytárních protilátek se zvyšuje. Díky citlivým metodám, dostupné technice a rozšířené znalosti jednotlivých protilátek je záchyt a určení specifity stále vyšší.

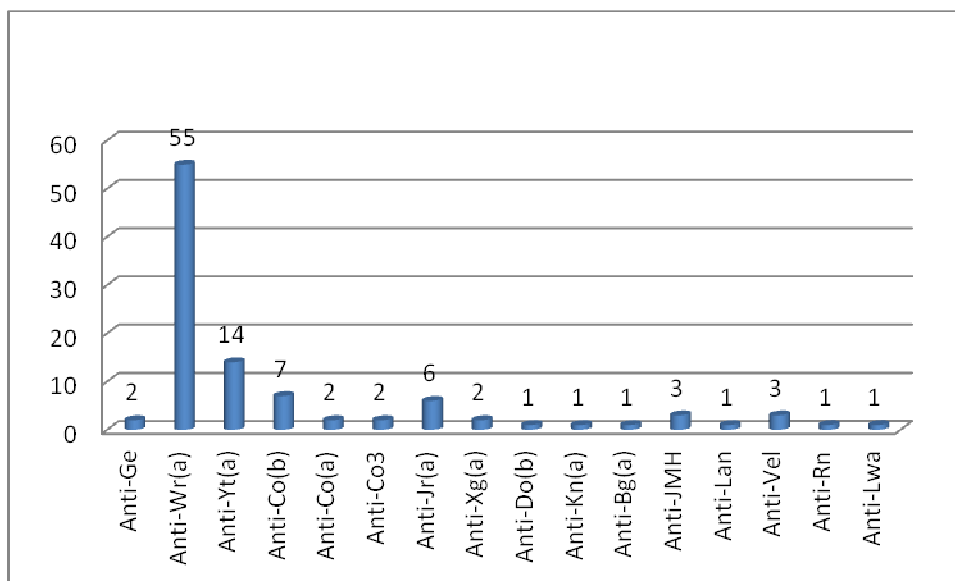
V období 1.1.2007 – 31.12.2011 bylo v NRL pro imunohematologii ÚHKT detekováno 3012 protilátek.

*Graf 5: Deset nejfrekventovanějších protilátek*



Nejčastěji detekované protilátky (anti-D, anti-E, anti-K) (viz graf 5) patří mezi klinicky významné protilátky, které mohou způsobit hemolytické potransfuzní reakce a hemolytické onemocnění novorozence a plodu.

Protilátky proti krevně skupinovým systémům Diego, Yt, Xg, Scianna, Dombrock, Colton, Landsteiner-Wiener, Gerbich, Cromer, Knops, Indian, Ok, John Milton Hagen, HFA a LFA mohou dovyšetřit rozšířenými metodami pouze v NRL pro imunohematologii. NRL pro imunohematologii vyšetřuje komplikované vzorky jak z České tak i ze Slovenské republiky. V období 1. 1. 2007 – 31. 12. 2011 bylo zachyceno a identifikováno celkově 102 protilátek proti zmíněným systémům, v procentuálním zastoupení 3,38 % (tabulka 83).



**Graf 6: Záchyt protilátek**

Nejvíce protilátek bylo zachyceno proti antigenu s nízkou frekvencí výskytu Wr(a), který patří do systému Diego, dále anti-Yt(a) ze systému Cartwright a protilátka anti-Jr(a) proti antigenu s vysokou frekvencí výskytu.

**Tabulka 78: Záchyt protilátek**

	Celkem	%
Anti-Ge	2	1,97
Anti-Wr(a)	55	53,92
Anti-Yt(a)	14	13,70
Anti-Co(b)	7	6,86
Anti-Co(a)	2	1,97
Anti-Co3	2	1,97
Anti-Jr(a)	6	5,88
Anti-Xg(a)	2	1,97
Anti-Do(b)	1	0,98
Anti-Kn(a)	1	0,98
Anti-Bg(a)	1	0,98
Anti-JMH	3	2,94
Anti-Lan	1	0,98
Anti-Vel	3	2,94
Anti-Rn	1	0,98
Anti-Lw(a)	1	0,98

## 23. LITERATURA

- [1] DANIELS G., *Human Blood Groups*, 2th Edition: Blackwell Science Ltd. 2002, s. 4-472, ISBN 978-0-6320-5646-0
- [2] KLEIN HARVEY G., ANSTEE DAVID J., *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine*, 11th edition Blackwell, 2005. s. 209-253. ISBN 978-0632-06454-0
- [3] ROBACK J.D., COMBS M.R., GROSSMAN B.J., HILLYER Ch. D., *Technical Manual*, 16th Edition, AABB, 2008, s.411-434. ISBN 978-1-56395-260-9
- [4] SCHENKEL-BRUNNER H., *Human Blood Groups Chemical and Biochemical Basis of Antigen Specificity*, 2th Edition, Springer WienNewYork 2000, s. 184-588. ISBN 3-211-83471-0
- [5] REID M. E., LOMAS-FRANCIS Ch., *The Blood Group Antigen*, 2th Edition, Academic Press, 2007, s.29-501, ISBN 978-0-12-586585-2
- [6] ISSITT P. D., ANSTEE D. J., *Applied Blood Group Serology*, 4th edition 1999, s 614
- [7] QUINLEY E. D., *Immunohematology Principles&Practice*, 3th Edition, ISBN-13:978-0-7817-8204-3, 2011, s.75-118
- [8] DEAN L., *Blood Groups and Red Cell Antigens*, National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892-6510, 2005.
- [9] BYRNE K.M., BYRNE P.C., *Review: other blood group systems – Diego, Yt, Xg, Scianna, Dombrock, Colton, Landsteiner-Wiener, and Indian*, Immunohematology, 2004, 1, Volume 20, str. 50-58.
- [10] JOHNSON N.C., *Xg: the forgotten blood group system*, Immunohematology 2011, 2, str. 68-71
- [11] VELLIQUETTE R.W., *Review: the Scianna blood group system*,

## 23. LITERATURA

Immunohematology, Volume 21, Number 2, 2005, s. 70-76

- [12] P.A.R. Brunker and W.A. Flegel, Scianna: the lucky 13th blood group system, Immunohematology, Volume 27,2, 2011, s. 41-57
- [13] LOMAS-FRANCIS C., REID M.E., *The Dombrock blood group system*, Immunohematology 2010, 26, 2, str. 71-76
- [14] CHAPEL-FERNANDES S. , *Dombrock genotyping in a native Congolese cohort revers two novel alleles*, Transfusion 2009, 49, str. 1662
- [15] BANZETOVÁ H., *První nález fenotypu Gy(a-) v České republice od jeho objevu v r. 1967*, Transfúze a hematologie dnes, 2007, s.
- [16] HALVERSON G.R., PEYRARD T.; *A review of the Colton blood group system*, Immunohematology, 26,1,2010,22-25.
- [17] WALKER P.S. and REID M.E., *The Gerbich blood group system: a review*, Immunohematology 2010, 2, Volume 26, s. 60-65
- [18] STORRY J.R, REID M.E., *The Cromer blood group system*; Immunohematology, Volume 18, Number 4, 2002. s. 95-100
- [19] ROYE-HUE K., LOMAS-FRANCIS Ch., *Three new high-prevalence antigens in the Cromer blood group system*, Transfusion 2007, 47:1621-1629
- [20] MOULDS J.M., *The Knops blood group system: a review*; Immunohematology 2010, 1, str. 2-5.
- [21] XU Q., *The Indian blood group system*, Immunohematology 3,2011, s.89-92
- [22] SMART E.A., STORRY J.R., *The Ok blood group system: a review*, Immunohematology 2010,3. Volume 26, str. 124-126
- [23] Willy A. Flegel, Qing Chen, Marion E. Reid, Judy Martin, Linda A. Orsini, Joyce Poole, Marilyn K. Moulds, a Franz F. Wagner, Transfusion, Volume 45, December 2005, s. 1940-1944



## 23. LITERATURA

- [24] návod Capture-R Screen, ImmucorGamma, Insert code 346-11, Rev 09/10
- [25] návod DG Gel Coombs, Diagnostics Grifols, S.A., revize 10/2003
- [26] návod Gamma Lewis Substance, ImmucorGamma, Insert code 3003-2; Rev 6/2009
- [27] návod Gamma P1 substance, ImmucorGamma, Inser code 3004-1, Rev. 10/2007
- [28] HOŘEJŠÍ V., *Poněkud neobvyklé membránové proteiny*, Vesmír 74, 625, 1995/11
- [29] MAYER B. a spol., *New antigen in the Dombrock blood group systém, DOYA, ablates expression of Do<sup>a</sup> and weakens expression of Hy, Jo<sup>a</sup> and Gy<sup>a</sup> antigens*, Transfusion 2010, 50, s. 1295-1299
- [30] FLEGEL W.A. a spol., *SCER and SCAN: two novel high-prevalence antigens in the Scianna blood group system*, Transfusion 45, 2005, s. 1940-1944